

Tannine als potente Modulatoren der Lebensdauer und Stressresistenz in *C. elegans*: Zwischen Langlebigkeit und Toxizität

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Biochem. Nadine Saul

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter:

1. Prof. Dr. Christian E.W. Steinberg
2. Prof. Dr. Rudolf K. Achazi
3. Senior lecturer Dr. Stephen R. Stürzenbaum

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2011

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Abstract	4
Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	8
1 Einleitung	9
1.1 Mechanismen der Alterung, Langlebigkeit und Stresstoleranz	9
1.1.1 Hormesis	9
1.1.2 Calorie Restriction	11
1.1.3 Bedeutende Theorien der Biogerontologie	12
1.2 Der Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i>	15
1.3 Die vielversprechenden Wirkungen pflanzlicher Polyphenole	19
1.3.1 Tannine: Facettenreiche polyphenolische Sekundärmetabolite	20
1.3.2 Tanninsäure	21
1.3.3 Gallussäure	22
1.3.4 Ellagsäure	22
1.3.5 Catechin	23
1.4 Ziele und Hypothesen dieser Arbeit	23
2 Experimentelle Durchführung	28
2.1 <i>C. elegans</i> - und <i>E. coli</i> -Kultivierung	28
2.2 Exposition mit den Testsubstanzen	28
2.3 Untersuchung von Lebensparametern	28
2.3.1 Lebensdauertest	28
2.3.2 Thermischer und oxidativer Stresstest	29
2.3.3 Larvale und adulte Entwicklung des Längenwachstums	30
2.3.4 Reproduktionstest	30
2.3.5 Qualitativer Mobilitätstest	30
2.3.6 Quantitativer Mobilitätstest	30
2.3.7 Attraktionstest	31
2.3.8 Pharynx-Pumpfrequenz	31
2.3.9 Auswertung und statistische Analyse	31
2.4 Molekularbiologische und funktionelle Untersuchungen	32
2.4.1 TOSC-Analyse	32
2.4.2 Bestimmung der DAF-16-Translokation	33
2.4.3 Gesamtgenomischer Microarray	33
2.4.4 Quantitative RT-PCR	35
2.4.5 Bestimmung des Triglyzerid-Gehalts	36

3 Ergebnisse	37
3.1 Effektive Modulation der Lebensdauer von <i>C. elegans</i> durch Tannine	37
3.2 Selektive Wirkung von Tanninen auf Stress	46
3.3 Schwache Auswirkungen der Tannine auf die Reproduktion	51
3.4 Tannine verursachen deutliche Veränderungen im Längenwachstum	53
3.5 Einfluss auf weitere Lebensparameter	56
3.6 Übersicht über die Veränderung der Lebensparameter	63
3.7 Veränderung des Genexpressionsmusters nach Tanninsäure-Exposition	64
3.8 Einfluss von Tanninen auf verschiedene Mutantenstämme	79
3.9 Keine Translokation von DAF-16	85
4 Diskussion	87
4.1 Überprüfung der 1. Hypothese	87
4.1.1 Modulation der Lebensdauer, Fitness und Stresstoleranz durch Tannine	87
4.2 Überprüfung der 2. Hypothese	90
4.2.1 Involvierung antimikrobieller Effekte in ES- und GS-vermittelter Langlebigkeit	90
4.2.2 Unzureichende Indizien für einen antioxidativen Wirkmechanismus	91
4.3 Überprüfung der 3. Hypothese	94
4.3.1 TS und ES sind hormetisch agierende Tannine	94
4.3.2 CR scheint nicht verantwortlich für GS- und CT-vermittelte Langlebigkeit zu sein	96
4.4 Überprüfung der 4. Hypothese	99
4.4.1 DAF-16 und der IIS sind nicht Hauptursache der Langlebigkeit	99
4.4.2 Mitglieder der OSR-1/UNC-43/SEK-1-Kaskade sind involviert	101
4.4.3 Weitere, potentiell verantwortliche Proteine	102
4.5 Überprüfung der 5. Hypothese	105
4.5.1 Keine einheitliche Alterungs-Theorie zur Beschreibung der Tanninwirkung	105
4.6 Überprüfung der 6. Hypothese	108
4.6.1 Tannine weisen individuelle Wirkwege auf	108
4.7 Kritische Betrachtung, Relevanz und Ausblick	120
5 Literaturverzeichnis	124
Anhang	153
Publikationen	167
Danksagung	169
Selbständigkeitserklärung	170

Zusammenfassung

Tannine sind pflanzliche, polyphenolische Sekundärmetabolite, die sich insbesondere aufgrund ihrer starken Protein-präzipitierenden und -bindenden Kapazität von anderen Polyphenolen unterscheiden. Dieses Charakteristikum ist offenbar verantwortlich für die beobachteten antinutritiven und gesundheitsschädlichen Wirkungen der Tannine. Jedoch dominieren in der Literatur die gesundheitsfördernden Beschreibungen, für die meist die antioxidative Kapazität verantwortlich gemacht wurde. Diese Arbeit soll durch nähere Betrachtung der Wirkwege einen Beitrag zur Analyse dieses Kontrastes leisten. Der Nematode und etablierte Modelorganismus *Caenorhabditis elegans* wurde zur Ermittlung der Tanninwirkung ausgewählt.

Die Fadenwürmer wurden mit Tanninsäure (TS), Gallussäure (GS), Ellagsäure (ES) und Catechin (CT) behandelt und bezüglich der Lebensdauer und Stressresistenz mit unbehandelten Tieren verglichen. Das vermutete Vorliegen eines „Calorie Restriction“ (CR)-Effektes aufgrund der antinutritiven Wirkungen als auch einer hormetischen Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde überprüft. Weiterhin wurden antimikrobielle und antioxidative Eigenschaften als potentielle Ursachen der Langlebigkeit untersucht und die Auswirkungen auf die Fitness und Genexpression analysiert. Der Vergleich der Tannine untereinander und mit anderen natürlichen Substanzen sowie die Einbeziehung verschiedener Alterungs-Theorien rundete die Analyse der Tanninwirkung ab.

Die Tannine konnten eine Lebensverlängerung in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen erwirken. Entgegen den Erwartungen, erwiesen sich Langlebigkeit und Stressresistenz als individuelle Parameter, die nicht zwangsläufig miteinander gekoppelt sind. Nur CT und TS führten zu ausgeprägten stressresistenten Phänotypen. Zudem zeigten nur TS und ES hormetische und CR-nachahmende Eigenschaften auf. Die antioxidative Kapazität der Tannine erschien jedoch irrelevant für die Langlebigkeit, im Gegensatz zur antimikrobiellen Eigenschaft der ES und GS. Darüber hinaus erwiesen sich unterschiedliche stressrelevante Gene essentiell für die Wirkung von CT und TS. Die differentielle Expression mehrerer hundert Gene durch TS unterstreicht die Komplexität der Wirkweise und offenbarte weitere potentiell lebensverlängernde Akteure. Parallel zur Lebensverlängerung bewirkten insbesondere TS und CT Einbußen in anderen Lebensparametern, wie der Reproduktion und des Wachstums, so dass sich hier die „Disposable Soma Theory“ widerspiegelt. Zudem scheint die Wirkweise von TS der „Mitohormesis“-Theorie und die der CT der „Green Theory of Ageing“ zu entsprechen. Nur wenige natürliche Substanzen zeigten vergleichbare Wirkungen mit diesen Tanninen.

Diese Arbeit zeigt insbesondere die individuelle und kontrastreiche Wirksamkeit der Tannine auf. Sie unterstreicht, dass Tannine molekulare Regulatoren sind, welche nicht nur auf ihre antioxidative und antinutritive Kapazität reduziert werden sollten.

Abstract

Tannins are plant-produced secondary metabolites with polyphenolic structure, which differ from other polyphenols in particular due to their protein precipitating and binding capacities. This characteristic is seemingly responsible for antinutritional and harmful effects. However, health benefits have also been extensively described in the literature. Indeed, antioxidant properties are believed to be the reason for these beneficial effects. This work aims to examine this apparent contradiction via a detailed mode of action approach. The established nematode model organism *Caenorhabditis elegans* was chosen to identify tannin induced mechanisms.

The roundworms were exposed to tannic acid (TS), gallic acid (GS), ellagic acid (ES), and catechin (CT) and compared to untreated animals concerning lifespan and stress resistance. The presence of a calorie restriction (CR) effect due to the antinutritional properties and a hormetic dose-response-relationship was verified. Furthermore, antimicrobial and antioxidative capacities were assessed as possible causes of longevity and the impact on fitness parameters and gene expressions was analysed. The comparison of the tannins among themselves and with other natural substances as well as the consideration of different ageing theories completed the analysis of the tannin action.

The tannins were able to prolong the lifespan over different concentration ranges. Against all expectations, longevity and stress resistance were shown to be independent entities, which are not necessarily linked. Only CT and TS led to distinct stress resistant phenotypes. Moreover, only TS and ES showed hormetic and CR-mimetic properties. The antioxidant capacities, however, appeared to be irrelevant for longevity, in contrast to the relevance of the antimicrobial properties of ES and GS. In addition, several stress relevant genes were deemed to be essential for the action of CT and TS. The regulation of several hundred gene expressions by TS underlined the complexity of the mode of action and revealed further potential players involved in lifespan extension. In parallel to longevity, especially TS and CT caused inhibiting effects in other life parameters, including reproduction and growth, which is in agreement with the “Disposable Soma Theory”. Moreover, the active principle of TS seems to conform to the “Mitohormesis Theory” and of CT to the “Green Theory of Ageing”. Only a few other natural substances showed analogous properties to the tannins analysed.

This work dissects the contrasting efficiency of the tannin family and underlines in particular, that tannins are molecular regulators, which should not be reduced to their antioxidative and antinutritional capacities.

Abkürzungsverzeichnis

A3	3. Adult-Tag
A6	6. Adult-Tag
A9	9. Adult-Tag
A β	Beta-Amyloid
Abb.	Abbildung
ABTS	Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
ACL	Antioxidative Kapazität lipidlöslicher Stoffe
ACW	Antioxidative Kapazität wasserlöslicher Stoffe
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BP	Biologischer Prozess
Ca ²⁺	Calcium
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II
Cd	Cadmium
cDNA	Komplementäre DNA
CR	Kalorien-Restriktion („Calorie Restriction“)
CT	Catechin
CYP	Cytochrom P450
Da	Dalton
DAO	„Dauer or aging adult overexpression“
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EGCG	Epigallocatechin-3-Gallat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES	Ellagsäure
Expr.	Expression
F1	Erste Filialgeneration
F2	Zweite Filialgeneration
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GO	Gen-Ontologie
GS	Gallussäure
GST	Glutathion-S-Transferase
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
HNF	Hepatozyten-Kernfaktor
HSP	Hitzeschockprotein
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IIS	Insulin/IGF-1-Signalweg
K	Kontrolle
K ⁺	Kalium
K-Platten	Kontrollplatten

L1	1. Larvenstadium
L2	2. Larvenstadium
L3	3. Larvenstadium
L4	4. Larvenstadium
LYS	Lysozym
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDR	Multiple Arzneimittelresistenz
MF	Molekulare Funktion
Mittl.	Mittlere
mRNA	Boten-RNA
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NGM	Nematoden-Wachstumsmedium
NSY	Neuronale Symmetrie
OD	Optische Dichte
P	Parentalgeneration
p38	Protein 38
p53	Protein 53
PKB	Proteinkinase B
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
Qualit.	Qualitative
Quant.	quantitative
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rRNA	Ribosomale RNA
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkriptase
SDR	Kurzkettige Dehydrogenase/Reduktase
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SOD	Superoxid-Dismutase
STR	Sieben-Transmembran-Rezeptor
Tab.	Tabelle
TG	Tage
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TIR	Toll- und Interleukin 1-Rezeptor Domäne
TOR	Ziel des Rapamycins
TOSC	„Total Oxidant Scavenging Capacity“
T-Platten	Tanninhaltige Platten
TS	Tanninsäure
UGT	UDP-Glucuronosyl-Transferase
UPR	Ungefaltete-Protein-Antwort
UV	Ultraviolett
ZK	Zelluläre Komponente

Weitere verwendete Abkürzungen für *C. elegans*-Gene befinden sich in den Tabellen 6 bis 9.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Mikroskopische Aufnahme eines <i>C. elegans</i> -Hermaphroditen	15
Abb. 2:	Schematische Darstellung eines <i>C. elegans</i> -Hermaphroditen	17
Abb. 3:	Schematische Darstellung der <i>C. elegans</i> -Hermaphroditen-Entwicklung bei 22°C	17
Abb. 4:	Strukturformeln der untersuchten Tannine	22
Abb. 5:	Dosis-Wirkungs-Kurven der vier Tannine	37
Abb. 6:	Überlebenskurven bei Tannin-Exposition mit zwei Futterqualitäten	44
Abb. 7:	Einfluss von Tanninsäure auf die oxidative und thermische Stressresistenz	47
Abb. 8:	Einfluss von Gallussäure auf die oxidative und thermische Stressresistenz	48
Abb. 9:	Einfluss von Ellagsäure auf die oxidative und thermische Stressresistenz	49
Abb. 10:	Einfluss von Catechin auf die oxidative und thermische Stressresistenz	50
Abb. 11:	Auswirkung der Tannine auf die Reproduktions-Kapazität	51
Abb. 12:	Zeitpunkt der ersten Eiablage	52
Abb. 13:	Initiale Reproduktions-Leistung	53
Abb. 14:	Veränderung der Körperlänge nach Tannin-Exposition	54
Abb. 15:	Entwicklung der Körperlänge unter Tannin-Einfluss	55
Abb. 16:	Veränderung der qualitativen Mobilität unter Tannin-Einfluss	56
Abb. 17:	Veränderung der quantitativen Mobilität unter Tannin-Einfluss	57
Abb. 18:	Der Effekt von Tanninen auf die Pharynx-Pumpfrequenz	58
Abb. 19:	Attraktion der Tannine	59
Abb. 20:	Triglyzeridgehalt Tannin-behandelter Nematoden	60
Abb. 21:	Antioxidative Kapazität der Tannine	60
Abb. 22:	TOSC-Analyse von Tannin-behandelten Nematoden	61
Abb. 23:	Akkumulation von TS in Nematoden	62
Abb. 24:	Zusammenfassung der relevantesten Bioassays	63
Abb. 25:	Anzahl differentiell exprimierter Gene nach Tannin-Exposition	64
Abb. 26:	GO-Analyse der Variation der Genexpression durch 100 µM TS	65
Abb. 27:	GO-Analyse der Variation der Genexpression durch 200 µM TS	66
Abb. 28:	GO-Analyse der Variation der Genexpression durch 300 µM TS	67
Abb. 29:	Variation der mittleren Lebensdauer durch 100 µM Tanninsäure	80
Abb. 30:	Variation der mittleren Lebensdauer durch 200 µM Catechin	81
Abb. 31:	Lebensdauer der <i>mev-1</i> -Mutante unter GS- und ES-Einfluss	82
Abb. 32:	Lebensdauer der <i>eat-2</i> -Mutante unter GS- und ES-Einfluss	83
Abb. 33:	Einfluss von Tanninsäure auf die thermische Stressresistenz verschiedener Mutantenstämme	84
Abb. 34:	Einfluss von Catechin auf die oxidative Stressresistenz verschiedener Mutantenstämme	84
Abb. 35:	Lokalisation von DAF-16::GFP nach Tannin-Exposition	86
Abb. 36:	Mechanismen der Tanninsäure-Wirkung	109
Abb. 37:	Mechanismen der Ellagsäure-Wirkung	110
Abb. 38:	Mechanismen der Gallussäure-Wirkung	111
Abb. 39:	Mechanismen der Catechin-Wirkung	112

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Tanninsäure	39
Tab. 2:	Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Gallussäure	40
Tab. 3:	Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Ellagsäure	41
Tab. 4:	Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Catechin	42
Tab. 5:	Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Tannine bei Fütterung toter Bakterien	43
Tab. 6:	Veränderung der Genexpression durch Tanninsäure in verschiedenen Gengruppen	70
Tab. 7:	Variation der Genexpression einzelner Gene nach TS-Exposition	72
Tab. 8:	Variation der Genexpression in starker Abhängigkeit der eingesetzten TS-Konzentration	74
Tab. 9:	Variation der Genexpression durch TS bei Lebensdauer- und Stress-assoziierten Genen	75
Tab. 10:	Mittelwerte der qRT-PCR-Analyse nach TS-Exposition	78
Tab. 11:	Übersicht über Fitness-relevante Ergebnisse	89
Tab. 12:	Übersicht über antioxidative Wirkungen	94
Tab. 13:	Übersicht über CR-relevante Testergebnisse	99
Tab. 14:	Studien zum Einfluss natürlicher Substanzen auf <i>C. elegans</i>	116
Tab. A1:	Verwendete Primer für die qRT-PCR	153
Tab. A2:	Einzelversuche zur Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Tanninsäure	154
Tab. A3:	Einzelversuche zur Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Gallussäure	156
Tab. A4:	Einzelversuche zur Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Ellagsäure	157
Tab. A5:	Einzelversuche zur Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Catechin	158
Tab. A6:	Einzelversuche zur Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Tannine bei Fütterung toter Bakterien	159
Tab. A7:	Lebensdauer von TS-behandelten Mutantenstämmen (Mittelwerte)	160
Tab. A8:	Lebensdauer von TS-behandelten Mutantenstämmen (Einzelversuche)	161
Tab. A9:	Lebensdauer von CT-behandelten Mutantenstämmen (Mittelwerte)	162
Tab. A10:	Lebensdauer von CT-behandelten Mutantenstämmen (Einzelversuche)	163
Tab. A11:	Lebensdauer von GS- und ES-behandelten Mutantenstämmen (Mittelwerte)	164
Tab. A12:	Lebensdauer von GS- und ES-behandelten Mutantenstämmen (Einzelversuche)	164
Tab. A13:	Thermotoleranztests mit Mutantenstämmen unter TS-Einfluss (Mittelwerte)	165
Tab. A14:	Oxidative Stresstests mit Mutantenstämmen unter CT-Einfluss (Mittelwerte)	166

1 Einleitung

1.1 Mechanismen der Alterung, Langlebigkeit und Stresstoleranz

Das Streben nach ewiger Jugend und Unsterblichkeit hat eine lange Tradition. Bereits Alexander der Große soll vor über 2000 Jahren nach dem mystischen Jungbrunnen gesucht haben (Stoneman, 1994). Heutzutage sind die wissenschaftlichen Bemühungen realistischer, aber nicht weniger ambitioniert. Die zahlreichen Berichte und Studien über potentiell lebensverlängernde Substanzen und Behandlungen sowie über die Ergründung der Alterungsursachen sind Indiz für das unermüdliche Forschungsbestreben in der Biogerontologie. Aber was wissen wir heute wirklich über das Phänomen Alterung? Auch wenn der Süßwasserpolytyp *Hydra* Seneszenz-resistent zu sein scheint (Martínez, 1998), scheint die Alterung eine annähernd universell gültige Erscheinung zu sein. Obwohl die Ursachen noch umstritten sind, sind die Folgen, wie das vermehrte Auftreten von kardiovaskulären, neurologischen und onkologischen Erkrankungen, doch allgemein bekannt. Schon 1825 berichtete Benjamin Gompertz über die Gesetzmäßigkeit der Mortalität und versuchte so, die Alterung mathematisch zu begreifen. Er erklärte, dass die Mortalitätsrate bei fortschreitendem Alter exponentiell steigt (siehe Olshansky, 2010). Mandavilli et al. (2002) definieren Alterung als ein multifaktorielles Phänomen, welches durch eine zeitabhängige Abnahme der physiologischen Funktionen gekennzeichnet ist. Diese recht deskriptiven Definitionen beantworten jedoch die elementaren Fragen der Biogerontologie nicht: Wie wird der Alterungsprozess molekular reguliert? Welche externen und internen Faktoren beeinflussen diesen Prozess? Und ist die Verlängerung des Lebens unter ökologisch-populationsdynamischen und unter medizinisch-individuellen Aspekten überhaupt sinnvoll und wünschenswert?

Um diese Fragen zu ergründen, wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen. Im Zuge dieser Untersuchungen konzentrierten sich viele Wissenschaftler auf zwei beobachtete und nahezu universelle Effekte: Der Hormesis und der „Calorie Restriction“- (Kalorienrestriktion) Effekt. Beide Effekte ermöglichen eine Lebensverlängerung ohne gentechnische Manipulationen und haben maßgeblich zur Analyse des Phänomens Alterung beigetragen. Sie sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

1.1.1 Hormesis

Hormesis (griech.: „Anregung, Anstoß“) beschreibt positive Effekte auf Lebensparameter (wie z.B. verringerte Mortalität) nach Exposition mit gering konzentrierten Wirkstoffen, welche in höheren Konzentrationen negative Auswirkungen aufweisen; was häufig durch eine U-förmige Dosis-Wirkungs-Kurve beschrieben wird (Calabrese & Baldwin, 2001a,b). Bisher noch nicht eindeutig beantwortet ist die Frage nach den zugrunde liegenden Wirkungsmechanismen für

dieses beobachtete Phänomen. Am häufigsten wird die Hypothese vertreten, dass geringe Mengen eines in höheren Dosen toxisch wirkenden chemischen Agens (Calabrese et al., 1987, 1999), biologischen Pathogens (Deocaris et al., 2005) oder einer physikalischen Behandlung (Upton, 2001; Rattan, 2004a) einen milden Stress ausüben, welcher Reparatur- und Stressabwehrsysteme, wie die Detoxifizierungs- oder Hitzeschockproteine, des Organismus stimuliert und trainiert. Der Organismus kann im Folgenden besser auf Stressoren reagieren und mögliche molekulare Schädigungen verringern (Calabrese, 2008; Mattson, 2008; Zhang et al., 2008). Es wird angenommen, dass diese adaptive Stressantwort zu verschiedenen positiven, individuellen Vorteilen führt, wie die Verlangsamung des Alterungsprozesses (Le Bourg, 2009). Mehr noch scheint Hormesis ein universelles Prinzip zu sein; unabhängig von Substanzklassen, Lebewesen und Endpunkten (Calabrese et al., 1999; Rozman, 2005; Calabrese, 2008).

Es mehren sich jedoch Hinweise, dass diese Hormesis-Darstellung reformiert werden sollte. Zum einen stellt Douglas (2008) überzeugend dar, dass es sich vielmehr um eine J-förmige Dosis-Wirkungs-Kurve handelt, die sich nur durch einen kleinen vorteilhaften und einen wesentlich größeren schädigenden Wirkungsbereich auszeichnet. Zudem wird die Annahme, dass jede Substanz Hormesis auslösen kann, durch Weltje et al. (2005) zumindest teilweise entkräftet. Es wurde hier demonstriert, dass bei verschiedenen endokrinen Disruptoren kein hormetisches Dosis-Wirkungs-Prinzip nachzuweisen ist. Darüber hinaus ist bislang kaum untersucht worden, ob der positive Hormesis-Effekt von negativen Nebenwirkungen begleitet wird. Stark (2008) argumentiert, dass die zusätzliche Energie für die Aktivierung des Stressabwehrsystems an anderer Stelle entnommen werden muss. Dies würde unweigerlich zu Defiziten in anderen Lebensparametern führen und Hormesis könnte nicht uneingeschränkt als positiv bezeichnet werden. Letztlich ist auch die adaptive Stressantwort als singulärer Erklärungsansatz fragwürdig. Steinberg et al. (2008) führen verschiedene Arbeiten auf, in denen distinkt veränderte Genexpressionsprofile bei Verwendung von hormetisch wirksamen Dosen im Vergleich zu höheren Konzentrationen gefunden wurden. Bei einer rein adaptiven Stressantwort sollten hohe und niedrige Wirkstoffkonzentrationen zwar zu unterschiedlichen Expressions-Intensitäten führen, jedoch nicht zu einer qualitativen Veränderung.

Die positiven Auswirkungen des Hormesis-Effektes umfassen unter anderem Verlängerung des Lebens (Neafsey, 1990; Le Bourg, 2009), Erhöhung der Stressresistenz (Gems & Partridge, 2008) sowie antikarzinogene Wirkung von Kanzerogenen (Fukushima et al., 2005; Snow et al., 2005). Die negativen Auswirkungen werden jedoch vergleichsweise selten diskutiert. Besonders kritisch ist der Hormesis-Effekt bei Antibiotika, die in subinhibitorischen Dosen hormetisch wirken können und somit auf Mikroorganismen ungewollt positive Effekte haben können. Auch auf Transkriptions-Ebene konnte gezeigt werden, dass subinhibitorische und inhibitorische Antibiotika-Konzentrationen unterschiedliche

Auswirkungen haben, da sie verschiedene Genexpressionsmuster aufwiesen (Davies et al., 2006). Vergleichbare Schwierigkeiten ergeben sich beim Einsatz von Chemotherapeutika (Calabrese & Baldwin, 2003), die in geringen Konzentrationen das Tumorwachstum beschleunigen können. Zudem wird Hormesis zumeist bei Individuen untersucht. Die Konsequenzen auf Populationsebene und auf das gesamte Ökosystem sind jedoch schwer überschaubar und bisher kaum erfasst worden (Chapman, 2001). Unklar ist bislang auch die Auswirkung einer hormetischen Behandlung auf die nachfolgenden Generationen. Werden negative Folgen in einem dieser Bereiche festgestellt, so muss diskutiert werden, ob der Hormesis-Effekt tatsächlich als positives Ereignis aufgefasst werden kann.

1.1.2 Calorie Restriction

„Calorie Restriction“ (CR) ist charakterisiert durch erhebliche Lebenszeitverlängerung sowie Alterungsverzögerung in Folge einer Reduktion der Nahrungszufuhr um ca. 30-50% der *ad libitum* zugeführten Nahrungsmenge. McCay & Crowell entdeckten bereits 1934, dass Ratten bei verminderter Nahrungsaufnahme signifikant länger lebten. Mit einigen Ausnahmen (Le Bourg & Minois, 1996; Forster et al., 2003; Cooper et al., 2004; Shanley & Kirkwood, 2006; Sohal, 2009) kann dieser Effekt in fast allen tierischen Lebensformen und Pilzen beobachtet werden (Heilbronn & Ravussin, 2003; Sinclair, 2005; Ingram et al., 2006). Die Nebenwirkungen dieser Nahrungsbeschränkung umfassen jedoch Wachstumshemmungen (McCay et al., 1935; Mörck & Pilon, 2006) und Einbußen in der reproduktiven Kapazität (Holliday, 1989; Vanfleteren & Braeckman, 1999; Martin et al., 2008).

Der Hintergrundmechanismus wird bislang kontrovers diskutiert (Lakowski & Hekimi, 1998; Masoro, 2003; Lenaerts et al., 2008). CR kann zum Einen als milder Stress aufgefasst werden, welcher wiederum hormetisch wirkt (Turturro et al., 2000; Rattan, 2004b). Eine andere Hypothese beschreibt, dass CR zu einer Verminderung der Stoffwechselrate und folglich zu einer Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies („Reactive Oxygen Species“, ROS) führt (Sohal & Weindruch, 1996); eine Annahme, die jedoch von anderen Autoren widerlegt wurde (Masoro et al., 1982; Houthoofd et al., 2002; Lin et al., 2002; Guarente, 2008). Weiterhin wurde eine maßgebliche Beteiligung von Sirtuinen an der CR-vermittelten Langlebigkeit gleichermaßen befürwortet (Tissenbaum & Guarente, 2001; Wood et al., 2004; Wang & Tissenbaum, 2006; Wolff & Dillin, 2006) als auch dementiert (Houthoofd & Vanfleteren, 2006; Kaeberlein et al., 2006; Tsuchiya et al., 2006; Greer & Brunet, 2009). Sirtuine sind NAD⁺-abhängige Histon-Deacetylasen, welche durch Entfernung von Acetylgruppen an H3- und H4-Histonen spezifische Geninformationen stilllegen können (Imai et al., 2000; Landry et al., 2000). Mehrfach wurde der Einfluss der Sirtuine auf die Lebensdauer verschiedener Modellorganismen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* beschrieben (Finkel et al., 2009), so dass eine Beteiligung am CR-Mechanismus durchaus plausibel erscheint. Eine

weitere Hypothese verwendet den TOR-(„Target of Rapamycin“) Signalweg als Erklärungsansatz (Blagosklonny, 2007; Stanfel et al., 2009). Die TOR-Kinase wird durch Nährstoff- und Stress-Signale induziert und reguliert unter anderem das Zellwachstum und die Zellteilung (Jia et al., 2004; Proud, 2004). Studien belegen, dass die Inhibition des TOR-Signalweges zu einem verlängerten Leben führt (Jia et al., 2004; Kapahi et al., 2004; Kaeberlein et al., 2005). In Mäusen (Wu et al., 2009), Fruchtfliegen (Kapahi et al., 2004) und der Bäckerhefe (Kaeberlein et al., 2005) konnte bereits eine Verbindung zwischen dem TOR-Signalweg und CR aufgezeigt werden. Zuletzt soll hier der hoch konservierte Insulin/IGF-1-(„Insulin-like Growth Factor 1“) Signalweg angesprochen werden. Der aktivierte Insulin/IGF-1-Signalweg (IIS) führt in *C. elegans* zur Inhibition des Transkriptionsfaktors DAF-16 (Kenyon et al., 1993; Vanfleteren & Braeckman, 1999; Lee et al., 2003), was letztlich zu einer Verkürzung der Lebensdauer führt. Aktiviertes DAF-16 hingegen transloziert in den Nukleus und reguliert dort positiv die Transkription vielzähliger Stressabwehr- und Reparaturproteine. DAF-16 wird zudem durch Bindung an das Sirtuin SIR-2.1 im Nukleus co-aktiviert (Berdichevsky et al., 2006; Berdichevsky & Guarente, 2006). Verschiedene Studien weisen auf eine essentielle Beteiligung des IIS am CR-Effekt hin (Vanfleteren & Braeckman, 1999; Hayashi et al., 2008; Shimokawa et al., 2008; Greer et al., 2009).

1.1.3 Bedeutende Theorien der Biogerontologie

Die Möglichkeiten der Lebensverlängerung durch Hormesis und CR gelten heutzutage als erwiesen, obgleich die Mechanismen nicht hinreichend geklärt sind. Zudem existieren bis zu 300 verschiedene Alterungs-Theorien (Medvedev, 1990), deren Wahrheitsgehalt noch nicht abschließend beurteilt werden kann. Die vielversprechendsten wurden selektiert und werden im Folgenden kurz dargestellt.

Die „**Free Radical Theory of Ageing**“ (auch als „Oxidative Damage Theory of Ageing“ bezeichnet) besagt, dass ROS, die insbesondere intrazellulär in den Mitochondrien als Respirations-Nebenprodukt gebildet werden (Dröge, 2002; Rea & Johnson, 2003), Schäden an der DNA, den Proteinen und den Membranlipiden verursachen. Diese Schäden akkumulieren mit der Zeit, führen zu dysfunktionalen Zellen oder zur Apoptose und verursachen somit die Alterung (Harman, 1956, 1972). Die steigende Beschädigung der Mitochondrien-DNA wiederum führt zur Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion. Es wird angenommen, dass beschädigte Mitochondrien mehr ROS generieren (Miquel et al., 1980; Finkel & Holbrook, 2000), was den Effekt beschleunigt. Dies wird häufig auch als „**Mitochondrial Theory of Ageing**“ bezeichnet. Unterstützt werden diese Annahmen durch die „**Rate of Living Theory**“ (Brys et al., 2007). Ihr zufolge ist die maximale Lebensdauer invers proportional zur metabolisierten Menge an Nahrungsenergie, wobei ein erhöhter Metabolismus wiederum positiv mit der ROS-Produktion korreliert. Diese Theorien werden bislang nicht zuletzt aufgrund von

widersprüchlichen Studien und der Entdeckung der ROS als wichtige Signalmoleküle kontrovers diskutiert (Ames et al., 1993; Sohal, 2002; Sohal et al., 2002; Rovira & Finkel, 2008; Alexeyev, 2009; Gems & Doonan, 2009; Perez et al., 2009).

Im Kontrast dazu steht die **Mitohormesis**-(oder auch mitochondriale Hormesis) Theorie. Mitohormesis bezeichnet die Annahme, dass die Steigerung der Mitochondrien-Aktivität und die daraus resultierenden freien Radikale zu einer hormetischen Aktivierung des Stressabwehrsystems führen (Houthoofd et al., 2002; Kharade et al., 2005; Sinclair, 2005; Tapia, 2006; Zarse et al., 2007). Schulz et al. (2007) konnten eine erhöhte mitochondriale Respiration und ROS-Produktion sowie ein verlängertes Leben und erhöhte Stresstoleranz unter Glukoselimitation in *C. elegans* beobachten. Interessanterweise konnten Antioxidantien die Lebensverlängerung inhibieren, was die Notwendigkeit der ROS-Moleküle an der Lebensverlängerung unterstreicht. Die Metastudie von Bjelakovic et al. (2007) führen zudem die lebensverkürzenden Eigenschaften einiger Antioxidantien auf und Brys et al. (2007) konnten zeigen, dass der langlebige *daf-2*-Mutantenstamm in *C. elegans* eine erhöhte ROS-Produktion aufweist. Die Mitohormesis-Theorie wird durch die festgestellte Steigerung der ROS-Bildung bei physischer Aktivität (welche erfahrungsgemäß lebensverlängernd wirkt) unterstrichen (Chevion et al., 2003).

Eine weitere Hormesis-basierende Theorie, die **Xenohormesis**-Hypothese, besagt, dass Lebensverlängerungen eines Organismus durch Phytoalexine (stress-induzierbare Sekundärmetabolite der Pflanzen) eines anderen Organismus ausgelöst werden können. Nach Bildung und ggf. Sekretion dieser Substanzen können sie von anderen Lebewesen in der Umgebung aufgenommen werden. Diese Moleküle dienen dann als Warnsignal für Stress-Bedingungen, auf die daraufhin der „Signalempfänger“ präventiv mit der Aktivierung seiner Stressabwehrmechanismen, im Sinne eines Hormesis-Effektes, reagiert. Dies wirkt sich letztlich positiv auf seine Lebensspanne aus. Als Hintergrundmechanismus wird die Nachahmung eines CR-Effektes durch Phytoalexin-vermittelte Sirtuin-Aktivierung diskutiert (Howitz et al., 2003; Lamming et al., 2004; Howitz & Sinclair, 2008).

Die „**Green Theory of Ageing**“ besagt, dass der Alterungsprozess von der Aktivität des Detoxifizierungssystems abhängig ist. Schädliche Substanzen, wie z.B. endogene Metabolite oder exogen zugeführte Xenobiotika, können durch eine erhöhte Aktivität des Detoxifizierungssystems schneller entgiftet werden. Dadurch verringert sich die Anzahl akkumulierender, molekularer Schäden und der Alterungsprozess wird verlangsamt. Für diese Theorie spricht die verstärkte Expression von Biotransformationsgenen bei langlebigen *daf-2*-Mutanten und Dauerlarven in *C. elegans* (McElwee et al., 2004; Gems & McElwee, 2005).

Einen evolutionsbiologischen Ansatz zum Verständnis des Alterns bietet die **„Disposable Soma Theory“** („Wegwerfkörperchen-Theorie“). Sie basiert ebenfalls auf der Annahme, dass die Alterung durch Akkumulation molekularer Schädigungen hervorgerufen wird. Die metabolischen Ressourcen eines Organismus werden gemäß dieser Theorie auf die Sektoren Wachstum, Reproduktion und die körperliche Erhaltung bzw. Reparatur aufgeteilt. Je mehr Ressourcen für Reparaturprozesse verwendet werden, desto langsamer schreitet die Alterung voran (Kirkwood, 1977, 1988; Kirkwood & Holliday, 1979; Kirkwood & Rose, 1991). Folglich kann angenommen werden, dass lebensverlängernde und alterungsverzögernde Maßnahmen zur Beeinträchtigung eines anderen Sektors führen. Als Konsequenz könnte eine verringerte Reproduktion oder ein gehemmtes Wachstum beobachtet werden. Da Tiere unter natürlichen Umständen meist vor Einsetzen der Alterungserscheinungen aufgrund von Prädatoren, Hunger oder Kälte sterben und da die Reproduktion einer der wichtigsten Faktoren zur Arterhaltung ist, ist die Lebensverlängerung evolutionsbiologisch eher irrelevant, so dass diesem Sektor nicht die maximale Energie zuteilwird.

Die ebenfalls evolutionsbiologisch argumentierende **Mutations-Akkumulations-Theorie** basiert auf dem sinkenden Selektionsdruck mit steigendem Alter (Medawar, 1952; Albin, 1993; Ljubuncic & Reznick, 2009). Mutationen, die erst in älteren, postreproduktiven Individuen zu Nachteilen führen, werden nicht ausselektiert und akkumulieren so über viele Generationen. Dies führt zu einem Anstieg an altersassoziierten Krankheiten und Erscheinungsbildern nach Abschluss der Reproduktionsphase. Die **„Antagonistic Pleiotropy Theory“** besagt ferner, dass Gene, die für eine gesteigerte Fitness im jungen Organismus verantwortlich sind, einen Selektionsvorteil besitzen, selbst wenn sie eine reduzierte Fitness im älteren Organismus hervorrufen (Williams, 1957). Die bekanntesten Beispiele sind das *p53*-Gen im Menschen, welches im jungen Lebewesen die Entstehung von Tumoren hemmt, jedoch zu einem späteren Zeitpunkt die Alterung voran treibt (Ferbeyre & Lowe, 2002) sowie Testosteron, welches in männlichen Menschen die reproduktive Fitness verbessert, jedoch im Alter die Wahrscheinlichkeit für Prostatakrebs erhöht (Gann et al., 1996).

Die populäre **Telomertheorie** stellt dar, dass die nichtkodierenden Chromosomenenden (Telomere) für die Stabilität der Erbinformation notwendig sind. Die stetige Verkürzung der Telomere bei jeder somatischen Zellteilung bewirkt Chromosomeninstabilität und führt zur Zellseneszenz oder Apoptose und somit letztlich zur Alterung des gesamten Organismus (Müller, 1938; McClintock, 1941; Shay & Wright 2001). In vielen Lebewesen, inklusive dem Menschen, scheint sich diese Theorie überwiegend zu bestätigen (Harley, 1997; Pardue & DeBaryshe, 1999; Monaghan & Haussmann, 2006). In *C. elegans* jedoch kann kein Hinweis auf eine

Beteiligung der Telomere im Alterungsprozess gefunden werden (Raices et al., 2005), da die Lebensspanne der Tiere nicht von der Telomerlänge beeinflusst wird und sich die somatischen Zellen in adulten Tieren im postmitotischen Zustand befinden. Dieser Theorie wird im weiteren Verlauf daher keine Aufmerksamkeit geschenkt.

1.2 Der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*



Abb. 1: Mikroskopische Aufnahme eines *C. elegans*-Hermaphroditen
Illustration mit Erlaubnis von: J. Berger & R. Sommer, Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen

Zur Erforschung der Alterung und Langlebigkeit bedient sich die Wissenschaft verschiedener Modellorganismen, die im Vergleich zu humanen Probanden kürzere Lebensspannen und zumeist ethische Unbedenklichkeit aufweisen und folglich häufig bevorzugt werden. Dazu zählen insbesondere die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Helfand & Rogina, 2003), die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Gershon & Gershon, 2000), verschiedene Nagetiere (Hazzard, 1991; Masoro, 1991) und *Caenorhabditis elegans* (Gershon & Gershon, 2002; Johnson, 2006, 2008).

Der in Böden und Sedimenten fast weltweit vorkommende und nur ca. 1 mm große Nematode (Fadenwurm) *C. elegans* (**Abb. 1**) weist eine Vielzahl interessanter Merkmale auf, die ihn zur Ergründung diverser wissenschaftlicher Fragestellungen unentbehrlich machen. Er enthält die wichtigsten Merkmale höherer Organismen, wie ein Nervensystem, eine Epidermis, einen Gastrointestinal-Trakt und Gonaden (Jorgensen & Mango, 2002) (**Abb. 2**). Das programmierte Absterben von 131 Zellen während der Embryonalentwicklung und die daraus resultierende Zellkonstanz von

959 somatischen Zellen im ausgewachsenen Tier (Hedgecock et al., 1983) ermöglichen eine intensive Analyse des Apoptoseprozesses (Twomey & McCarthy, 2005; Peden et al., 2008). Von besonderem Interesse für Ökologen und Ökotoxikologen ist die Existenz einer Vielzahl von schadstoffinduzierbaren Genen (Custodia et al., 2001; Menzel et al., 2002) und seine hohe Sensitivität gegenüber Umweltschadstoffen (Traunspurger et al., 1995), welche sowohl mit der Nahrung als auch über seine dünne Kutikula aufgenommen werden. Zudem ist der Nematode eine ökologische Herausforderung, da er bislang nur in menschlich assoziierten Lebensräumen, wie z.B. im Kompost, aufgefunden wurde und sein natürlicher, ursprünglicher Lebensraum bislang unbekannt ist (Kiontke & Sudhaus, 2006). Entwicklungs- und Zellbiologen profitieren von seinem transparenten Körper. Dieses Merkmal erlaubt die Beobachtung der Entstehung der einzelnen Zellen unter einem Mikroskop, welche bis zu ihren Ursprüngen in den Blastomeren zurückverfolgt werden können. Darüber hinaus weist *C. elegans* ungewöhnliche Fortpflanzungseigenschaften auf. Nur ungefähr 0,2% der Individuen einer *C. elegans*-Population sind männlich, der überwiegende Teil besteht aus Hermaphroditen (Hodgkin et al., 1979). Diese können sich sowohl selbst befruchten als auch von den wenigen Männchen befruchtet werden. Dies steht, mit Ausnahme des ebenfalls hermaphroditischen *Caenorhabditis briggsae*, im Kontrast zu anderen *Caenorhabditis*-Spezies und ist daher evolutionsbiologisch ein spannendes Phänomen (Kiontke & Sudhaus, 2006; Haag et al., 2007). Selbst zur Erforschung komplexer menschlicher Erkrankungen wie Alzheimer (Link, 2006; Morcos & Hutter, 2009), onkologischen Erkrankungen (Saito & van den Heuvel, 2002; Poulin et al., 2004; Jannot & Simard, 2006) und Diabetes (Morcos & Hutter, 2009) wird der Nematode mit Erfolg herangezogen; nicht zuletzt da für rund 60% der humanen Gene, die mit Krankheiten assoziiert sind, ein entsprechendes homologes Gen in *C. elegans* zu finden ist (Wildner & Tovar, 1999; Saito & van den Heuvel, 2002), so dass viele Forschungsergebnisse direkt in der medizinischen Forschung eingesetzt werden können.

Die Biogerontologie profitiert von seinem kurzen Lebenszyklus (**Abb. 3**). *C. elegans* ist ektotherm, so dass sich seine Stoffwechselrate und die Geschwindigkeit dieses Zyklus mit steigender Umgebungstemperatur erhöht. Ca. zwei Tage nach dem Schlüpfen (bei 20°C Umgebungstemperatur) beginnen die Tiere mit der Ablage von bis zu 300 Eiern. Diese Reproduktionsphase ist meist am 4.-5. Adult-Tag abgeschlossen und das Tier beginnt merklich zu altern. Dies ist besonders deutlich an der Verminderung der Pharynx-Pumpfrequenz als auch an der Verlangsamung der Bewegungen zu erkennen. Nach ca. 30 Tagen sind meist alle Tiere gestorben, wobei der Median bereits nach 14-18 Tagen erreicht ist.

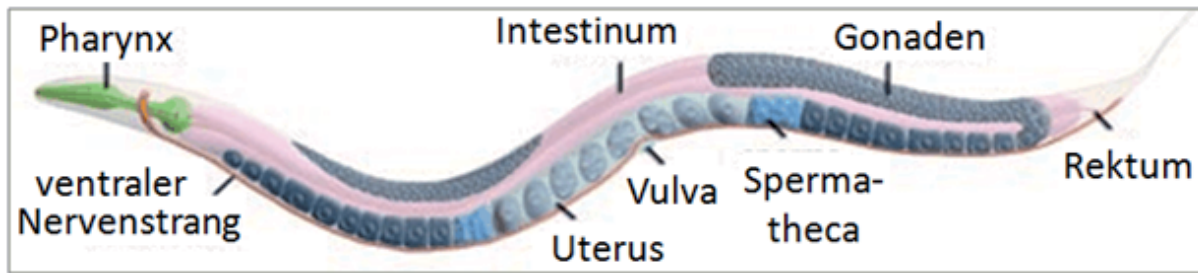


Abb. 2: Schematische Darstellung eines *C. elegans*-Hermaphroditen

Illustration mit Erlaubnis von: Z.F. Altun & D.H. Hall (2009) Introduction. In: WormAtlas. Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi:10.3908/wormatlas.1.1

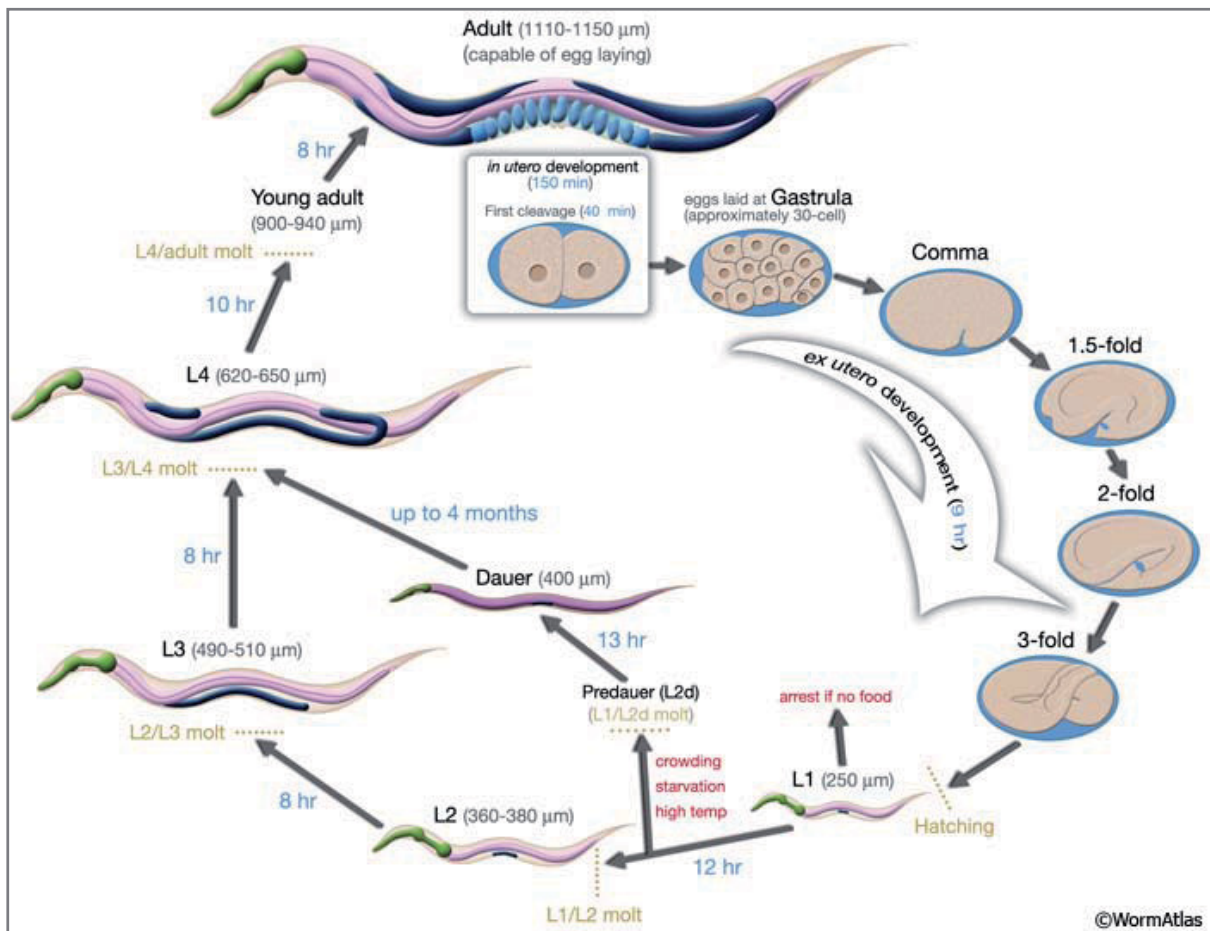


Abb. 3: Schematische Darstellung der *C. elegans*-Hermaphroditen-Entwicklung bei 22°C

Illustration mit Erlaubnis von: Z.F. Altun & D.H. Hall (2009) Introduction. In: WormAtlas. Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi:10.3908/wormatlas.1.1

Von großer Bedeutung für die Biogerontologie und Stressbiologie ist zudem das Vorhandensein des Dauerlarvenstadiums. L2-Larven (2. Larvenstadium) können bei ungünstigen Lebensbedingungen eine Dauerform ausbilden, aus der sich auch noch nach einigen Monaten adulte Tiere entwickeln können, sofern sich die Bedingungen verbessert haben (Vanfleteren & Braeckman, 1999; Hu, 2007; Wang et al., 2009). *C. elegans* ist in der Natur meist in dem durch Dauerpheromone induziertem Dauerstadium zu finden. Es ermöglicht den Tieren auch große, zeitaufwändige Distanzen,

meist mit Hilfe von Transporttieren wie Schnecken, zu überbrücken. So können bei ungünstigen Bedingungen neue Habitate erschlossen werden.

Die Erforschung dieser erstaunlichen Lebensverlängerung in Dauerlarven führte zu der Entdeckung diverser Gene und Signalwege, die zur Aufklärung des Alterungsprozesses und der Stressphysiologie maßgeblich beigetragen haben (Kenyon et al., 1993; Riddle & Albert, 1997). *C. elegans* weist zudem weitere bedeutende Kriterien eines Modellorganismus in der Alterungsforschung auf: Seine leichte Kultivierung, die kurze Lebensdauer und Generationszeit, die Existenz von lang- und kurzlebigen Mutantenstämmen, sowie das komplett sequenzierte Genom mit einer relativ hohen Übereinstimmung zum humanen Genom versprechen schnelle und aussagekräftige Ergebnisse.

Mindestens vier Methoden zur Verlängerung des Lebens und Verzögerung des Alterungsprozesses sind in *C. elegans* bereits bekannt. Dazu zählen i) der Hormesis- und ii) der CR-Effekt, iii) verschiedene genetische Manipulationen sowie iv) Behandlungen mit synthetischen oder natürlichen Substanzen. Hormetisch induzierte Langlebigkeit konnte mit Hilfe von gering dosierten, diversen Chemikalien und physikalischen Stressoren, wie Hitzebehandlungen, erlangt werden (Yashin et al., 2001; Cypser & Johnson, 2002; Hartwig et al., 2009; Le Bourg, 2009). Cypser et al. (2006) konnten eine Relevanz der auch an der Dauerformation beteiligten Gene *daf-16*, *daf-18* und *daf-12* an der Vermittlung der hormetischen Langlebigkeit nachweisen. Ein durch Strahlung hervorgerufener Hormesis-Effekt konnte in *C. elegans* jedoch nicht beobachtet werden (Johnson & Hartman, 1988; Cypser & Johnson, 2002). Ein CR-Effekt kann in Nematoden auf verschiedene Weise ausgelöst werden, wobei die Verwendung eines axenischen Mediums, in dem sich weder *E. coli* noch andere Spezies befinden, mit 50-80% Lebensverlängerung besonders effizient ist (Walker et al., 2005). Ein Zusammenhang mit dem IIS oder einer metabolischen Drosselung werden als Hintergrundmechanismen des CR-Effektes in *C. elegans* kontrovers diskutiert, zumeist jedoch angezweifelt (Walker et al., 2005; Houthoofd & Vanfleteren, 2006; Schaffitzel & Hertweck, 2006; Hayashi et al., 2008). Darüber hinaus wurden CR-vermittelnde Mutanten etabliert, wie z.B. *eat-2*, die aufgrund einer verminderten Pharynx-Pumpfrequenz nur über eine eingeschränkte Nahrungsaufnahme und somit über ein verlängertes Leben verfügen (Lakowski & Hekimi, 1998; Huang et al., 2004). Mittlerweile sind bereits über 270 Gene bekannt, deren Abschaltung die Lebensspanne von *C. elegans* drastisch verändern können (Partridge, 2008). Zumeist handelt es sich dabei um Genmutationen des IIS, sowie IIS-unabhängige Gene, die direkten Einfluss auf die DAF-16-Aktivität haben (Schaffitzel & Hertweck, 2006; Braeckman & Vanfleteren, 2007). Collins et al. (2006) bieten darüber hinaus einen interessanten Überblick über Substanzen, die ohne genetische Manipulationen zur Lebensverlängerung in *C. elegans* geführt haben. Dazu zählen Antiepileptika, Antioxidantien wie Vitamin E als auch zwei Pflanzenextrakte aus Blaubeeren (Polyphenol-reicher Extrakt) und aus

Gingko Biloba. Für diese Arbeit besonders relevant ist die lebensverlängernde Eigenschaft des Polyphenols Resveratrol, welche jedoch kontrovers diskutiert wird. Wood et al. (2004), Viswanathan et al. (2005) und Gruber et al. (2007) konnten eine lebensverlängernde Wirkung feststellen, jedoch konnten Bass et al. (2007) nur einen sehr variablen und schwachen Effekt beobachten. Als weitere lebensverlängernde, natürliche Substanzen in *C. elegans* haben sich unter anderem das Polyphenol Quercetin (Kampkötter et al., 2007b, 2008; Saul et al., 2008; Pietsch et al., 2009), α -Liponsäure (Brown et al., 2006) und die auf polyphenolen Bausteinen basierenden Huminstoffe, wie Huminfeed® (Steinberg et al., 2007), herausgestellt. Eine nähere Betrachtung dazu erfolgt im Kapitel 4.6.

Nicht zuletzt aufgrund der beobachteten Lebensdauer-modulierenden Eigenschaften einiger Polyphenole bzw. Polyphenol-reicher Extrakte verdient diese Substanzgruppe eine nähere Betrachtung. Daher widmet sich diese Arbeit einer polyphenolischen Subgruppe, den Tanninen.

1.3 Die vielversprechenden Wirkungen pflanzlicher Polyphenole

Pflanzen bilden und sekretieren verstärkt unter Stress und Mangelbedingungen diverse polyphenolische Sekundärmetabolite. Diese Metabolite spielen eine wichtige Rolle im Abwehrmechanismus der Pflanze gegen pathogenen Stress, wie bakterielle und mykologische Infektionen (Bennett & Wallsgrove, 1994; Kuc, 1995). Aber nicht nur Pflanzen profitieren von diesem Sekundärmetabolismus: Pflanzliche Polyphenole sind auch Gegenstand medizinischer, pharmazeutischer und ernährungswissenschaftlicher Forschung. Ihre nachgewiesene antioxidative Wirkung (Duthie et al., 2003; Frei & Higdon, 2003; Ariga, 2004), ihr präventiver Schutz vor altersbedingten Krankheiten, wie Krebs (Lee & Lee, 2006; Duthie, 2007; Bonfili et al., 2008), kardiovaskulären Erkrankungen (Knekt et al., 2002; Manach et al., 2005) und neurodegenerativen Störungen (Ramassamy, 2006; Singh et al., 2008) und nicht zuletzt die beobachtete Lebensverlängerung und Stressresistenz in diversen Modellorganismen (Howitz et al., 2003; Wood et al., 2004; Baur et al., 2006; Wilson et al., 2006; Kampkötter et al., 2008; Saul et al., 2008; Pietsch et al., 2009) resultierten in einer großen kommerziellen Vermarktung von polyphenolischen Nahrungsergänzungsmitteln. In der Vergangenheit wurden insbesondere die antioxidativen Kapazitäten der Polyphenole für die gesundheitsfördernden Eigenschaften verantwortlich gemacht. Neuere Studien weisen jedoch auf einen (zumindest teilweise) antioxidativ-unabhängigen oder sogar prooxidativen Mechanismus hin (Akagawa et al., 2003; Nakagawa et al., 2004; Galati et al., 2006; Maeta et al., 2007). Zudem wurde gezeigt, dass Polyphenole Einfluss auf die Genexpression nehmen und mittels verschiedener Signalkaskaden agieren (Williams et al., 2004; Narayanan, 2006; Wilson et al., 2006; Pietsch et al., 2009). Darüber hinaus sind die in der Literatur beschriebenen Polyphenol-vermittelten Phänotypen sowohl in Quantität als auch in

Qualität sehr divers, so dass eine einfache antioxidative Wirkung allein als Erklärungsmoment für die positiven Auswirkungen auf die Gesundheit nicht ausreicht (Stevenson & Hurst, 2007). Dies wird durch die Arbeiten von Doonan et al. (2008b), Gems & Doonan (2009) und Pun et al. (2010) gestützt. Sie konnten zeigen, dass antioxidative Wirkungen und Langlebigkeit in *C. elegans* nicht miteinander korrelieren. Vielmehr scheinen Polyphenole auf hormetischer Ebene zu funktionieren: Ihr toxisches Potential nutzt die Pflanze zur Schädlingsabwehr, in höheren Organismen ist diese Toxizität jedoch nur ein milder Stress, welcher den Hormesis-Effekt auslösen kann (Lindsay, 2005; Mattson et al., 2007; Son et al., 2008).

1.3.1 Tannine: Facettenreiche polyphenolische Sekundärmetabolite

Tannine (von franz. „tanin“: Gerbstoff) sind sehr häufig vorkommende, pflanzliche Sekundärmetabolite mit polyphenolischer Struktur und einem Molekulargewicht zwischen 500 und 3000 Da, selten sogar bis zu 30.000 Da. Das definierende Charakteristikum der Tannine und Unterscheidungsmerkmal zu anderen Polyphenolen ist ihre Fähigkeit zur Proteinpräzipitation, was ihren traditionellen Einsatz zur Lederherstellung und ihren astringenten Charakter erklärt. Tannine binden Proteine mit Hilfe von Wasserstoffbrückenbindungen, kovalenten Bindungen oder hydrophoben Interaktionen. Ihre zahlreichen freien Hydroxygruppen sind für diese Bindungen und für die Proteinpräzipitation von entscheidender Bedeutung.

Diese doch sehr allgemeine Definition führt dazu, dass Tannine eine Vielzahl verschiedener Strukturen umfassen. Unterteilt werden diese Metabolite in komplexe Tannine, Phlorotannine, hydrolysierbare und kondensierte bzw. nicht hydrolysierbare Tannine. Phlorotannine wurden bislang nur in marinen Braunalgen gefunden und sind monomere oder oligomere Phloroglucin-(1,3,5-Trihydroxybenzol) Derivate. Komplexe Tannine enthalten Strukturelemente aus verschiedenen Gruppen, so wie die Procyanidino-Ellagtannine, bestehend aus Catechin und Ellagtannin. Kondensierte Tannine sind Oligomere oder Polymere aus flavonoiden Monomeren, meist Catechin-Derivaten. Kondensierte Tannine bilden unter Säureeinfluss unlösliche Phlobaphene und Anthocyanidine und werden daher auch Proanthocyanidine genannt. Hydrolysierbare Tannine enthalten im Gegensatz dazu meist ein zentrales Glukosemolekül (oder einen anderen mehrwertigen Alkohol), welches mit Gallussäure-(Gallotannin) oder Hexahydroxydiphensäure-(Ellagtannin) Molekülen verestert ist. Sie zerfallen durch saure oder enzymatische Hydrolyse in ihre Monomere, wobei sich die Hexahydroxydiphensäure nach der Hydrolyse spontan in die stabilere Ellagsäure umwandelt. Die Monomere Catechin und Gallussäure haben im Gegensatz zur Ellagsäure und zu den größeren Tanninkomplexen ein zu geringes Molekulargewicht (**Abb. 4**), um Proteine effektiv zu präzipitieren, jedoch gehen sie sehr wohl Bindungen mit Proteinen ein. Diese Angaben sowie weiterführende Informationen zur Tannin-Chemie sind Singleton (1981), Salunkhe et al. (1990), Hagerman (2002), Koleckar et al. (2008) und Serrano et al. (2009) zu entnehmen.

Tannine sind wesentliche Grundbausteine der Huminstoffe und somit sehr abundant in der Natur (Leenheer & Rostad, 2004). Zudem sind sie häufig in menschlicher Nahrung enthalten (Serrano et al., 2009), daher wurden auch diese Polyphenole, mit überwiegend positiven Ergebnissen, auf ihre gesundheitsfördernden Eigenschaften getestet (Chung et al., 1998b; Buzzini et al., 2008; Koleckar et al., 2008). Zudem scheinen Tannine eine hormetische Wirksamkeit aufzuweisen (De Nicola et al., 2004, 2007; Pagano et al., 2008). Jedoch wurde in zahlreichen Studien auch auf die antinutritiven Effekte von Tanninen hingewiesen. Diese Effekte sind durch Verminderung der Nahrungsaufnahme, Hemmung des Wachstums, Verringerung der metabolisierbaren Energie und der Proteinverdauung gekennzeichnet (Butler, 1992; Carmona, 1996; Chung-MacCoubrey et al., 1997; Carbonaro et al., 2001). Grund für die antinutritiven Effekte ist zum Einen der astringente Charakter der Tannine, welcher die Genießbarkeit der Nahrung einschränkt. Zum Anderen verhindert die starke Proteinbindung die Bioverfügbarkeit der Nahrungsproteine. Ferner werden Verdauungsenzyme durch Präzipitation an ihrer Arbeit gehindert (Singleton, 1981).

1.3.2 Tanninsäure

Tanninsäure (TS) (**Abb. 4a**) gehört zu den hydrolysierbaren Tanninen und besteht aus fünf Digallussäure-Resten, die kovalent an ein zentrales Glukosemolekül gebunden sind (Penta-m-Digalloyl-Glukose). Es sollte beachtet werden, dass TS insbesondere in der populärwissenschaftlichen Literatur häufig und fälschlicherweise mit dem Oberbegriff Tannin gleichgesetzt wird.

Aufgrund seines astringenten Charakters wurde dieses Gallotannin in verschiedenen Medikamenten verwendet, darunter sind Mittel gegen Verbrennungen, Diarrhöe, Vergiftungen und Mittel zur Blutstillung. Zudem kommt es in zahlreichen Lebensmitteln und Getränken vor oder wird als Aromastoff hinzugefügt, so dass Menschen beim Verzehr von Weintrauben, Beeren, Nesseln, Rotwein, Tee und Süßigkeiten auch TS zu sich nehmen (Singleton, 1981; Hupkens et al., 1995; Sanyal et al., 1997; Khan et al., 2000).

Diverse gesundheitsfördernde Wirkungen der TS wurden dokumentiert, so die Amyloid-hemmenden (Ono et al., 2004), neuroprotektiven (Yazawa et al., 2006), antimikrobiellen (Chung et al., 1998a; Taguri et al., 2004; Kim et al., 2009), krebs-hemmenden und antimutagenen (Huang et al., 1985; Kamei et al., 1999; Taffetani et al., 2005; Chen et al., 2009) sowie antioxidativen (Lopes et al., 1999; Andrade et al., 2005, 2006) Eigenschaften. Im Kontrast dazu stehen die vermeintlich schädigenden, prooxidativen Eigenschaften (Khan et al., 2000; Varanka et al., 2001; Labieniec et al., 2003), sowie die antinutritiven Effekte, die auch der TS zugeschrieben werden (Mosha et al., 1995; Carbonaro et al., 2001; Samanta et al., 2004). Zudem konnte in einigen Studien ein toxisches Potential der TS festgestellt werden (Arhelger et al., 1965; Singleton, 1981; Zhu et al., 1992; Wauters et al. 2001). In *C. elegans* wurden bislang noch keine Studien mit TS durchgeführt.

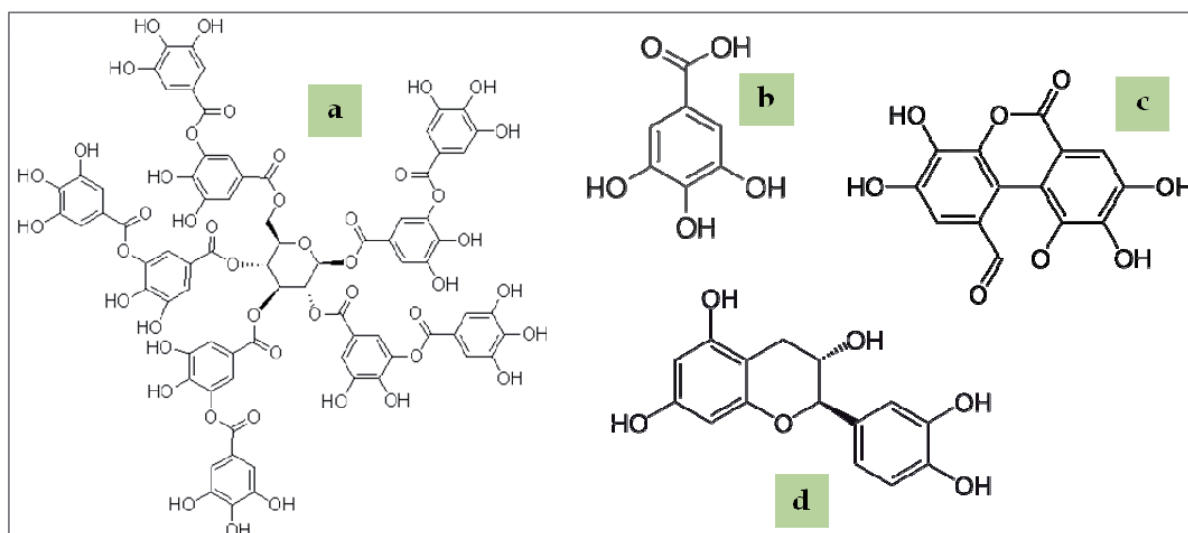


Abb. 4: Strukturformeln der untersuchten Tannine.

a) Tanninsäure, MW: 1701,22 g/mol, **b)** Gallussäure, MW: 170,12 g/mol, **c)** Ellagsäure, MW: 338,20 g/mol und **d)** Catechin, MW: 290,27 g/mol.

1.3.3 Gallussäure

Gallussäure (3,4,5-Trihydroxybenzoesäure; GS) (**Abb. 4b**) ist eine aromatische Hydroxycarbonsäure, die den Grundbaustein der Gallotannine darstellt. Sie kommt in freier ungebundener Form insbesondere in der Eichenrinde, in Galläpfeln, in grünem und schwarzem Tee, diversen Beeren und im Wein vor. Verwendung findet die GS unter anderem bei der Herstellung von Tinte, Farbe und Arzneimitteln sowie als Antioxidationsmittel in der Lebensmittelproduktion (Singleton, 1981; Niho et al., 2001; Shahrzad et al., 2001; Ow & Stupans, 2003).

Auch dieses Polyphenol verfügt sowohl über potente antioxidative (López-Vélez et al., 2003; Roginsky, 2003; Sohi et al., 2003), als auch prooxidative Kapazitäten (Sakagami & Satoh, 1997; Strlic et al., 2002; Labieniec et al., 2003). Es wirkt darüber hinaus antimikrobiell (Nohynek et al., 2006; Kang et al., 2008), tumorhemmend (Sakagami et al., 1997; Isuzugawa et al., 2001; Madlener et al., 2007; Giftson et al., 2009), neuroprotektiv (Ban et al., 2008) und kann zur Behandlung von Diabetes eingesetzt werden (Huang et al., 2005; Katz et al., 2007). Es gibt Hinweise, dass GS anthelminthisch wirkt und sich negativ auf die Viabilität von *C. elegans* auswirken kann (Smith et al., 2009). Detaillierte Tests zur Lebensdauer oder Stressresistenz von GS-behandelten *C. elegans*-Tieren sind bislang aber nicht durchgeführt worden.

1.3.4 Ellagsäure

Ellagsäure (ES) (**Abb. 4c**) ist im Gegensatz zu vielen anderen Tanninen und Tanninbausteinen nur schlecht in Wasser löslich und besteht strukturell aus zwei Molekülen GS. Sie ist Bestandteil von Wallnüssen und Pekannüssen, sowie diverser Früchte, wie Erdbeeren, Himbeeren und Trauben (Marwan & Nagel 1986; Vatter & Shetty, 2005; Bell & Hawthorne, 2008). Meist kommt ES bzw. das Vorläufermolekül Hexahydroxydiphensäure in gebundener Form in den Ellagtanninen vor und kann

leicht durch Hydrolyse abgespalten werden. Zahlreiche gesundheitsfördernde Eigenschaften werden der ES zugeschrieben, darunter antimutagene und antikarzinogene Kapazitäten (Teel, 1986; Zhang et al., 1993; Khanduja et al., 1999), antioxidative Wirkung (Hassoun et al. 1997; Yu et al., 2005), entzündungshemmende (Rogerio et al., 2008; Chao et al., 2010) und blutstillende Eigenschaften (Girolami, 1967; Girolami & Cliffton, 1967). Labieniec et al. (2003) stellten jedoch auch bei ES ein prooxidatives Potential fest.

1.3.5 Catechin

Catechine gehören zu den kondensierten bzw. nicht-hydrolyisierbaren Tanninen und kommen in verschiedenen strukturellen Varianten vor. Besonders reichhaltig an Catechinen sind Äpfel, Weintrauben, grüner Tee und Kakao (Li et al., 2002; Henning et al., 2003; Shibusawa et al., 2003; Kofink et al., 2007). Sie sind die mit am besten untersuchten Polyphenole und eine Vielzahl von gesundheitsfördernden Eigenschaften wurden für die am häufigsten vorkommenden Catechine wie Epicatechin, Epigallocatechin, Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG) und Epicatechin-3-Gallat dokumentiert (Higdon & Frei, 2003; Crespy & Williamson, 2004; Fisher & Hollenberg, 2005; Zaveri, 2006; Arts, 2008). Das Flavonoid Catechin (CT) (3,5,7,3',4'-Penta-hydroxyflavan, **Abb. 4d**) selbst wurde jedoch seltener untersucht, wobei der Focus hier auf der protektiven Eigenschaft gegenüber oxidativem Stress (Kim et al., 1995; Inanami et al., 1998; Feng et al., 2001; Jeon et al., 2003; Huang et al., 2005, 2006; Dani et al., 2008) und der antimikrobiellen Wirkung (Bais et al., 2002; Veluri et al., 2004) lag.

Catechin-Studien mit *C. elegans* sind rar. Brown et al. (2006) stellten fest, dass EGCG der altersbedingten Abnahme der pharyngealen Pumpfrequenz in *C. elegans* entgegen wirken kann. Mohri-Shiomi & Garsin (2008) ermittelten antioxidative Eigenschaften von EGCG *in vivo* und Zhang et al. (2009) konnten eine EGCG-vermittelte Stressprävention beobachten. Eine Lebensverlängerung in Abwesenheit von zugeführten Stressoren konnte jedoch in keiner der Studien beobachtet werden. Im Gegensatz dazu fanden Abbas & Wink (2009) durchaus eine lebensverlängernde Wirkung und eine gesteigerte Stressresistenz bei Verwendung von EGCG. Die meines Erachtens einzige Untersuchung mit monomerem Catechin und *C. elegans* ergab, dass (+)-Catechin und (-)-Epicatechin keine toxischen Effekte aufweisen, die Lebensdauer wurde jedoch nicht untersucht (Mukai et al., 2008).

1.4 Ziele und Hypothesen dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit werden die Auswirkungen der Tannin-Exposition auf die Lebensdauer und Stresstoleranz in *C. elegans* untersucht. Hierfür wurden die Tannine bzw. Tanninbausteine (im Folgenden vereinfacht als Tannine bezeichnet) Catechin, Tanninsäure, Ellagsäure und Gallussäure ausgewählt. Die Analyse der

zugrundeliegenden, molekularen Hintergrundmechanismen, der Vergleich der Substanzwirkungen untereinander und mit anderen Polyphenolen sowie die Evaluierung der Alterungs-Theorien stehen dabei im Vordergrund dieser Untersuchung. Ziel ist es, charakteristische Auswirkungen der Tannin-Exposition zu ermitteln und diese im Gesamtkontext zu analysieren, um die Wirkmechanismen darzustellen. Diese Arbeit soll so auch einen Beitrag zur Einschätzung der gesundheitsförderlichen als auch gesundheitsschädlichen Wirkwege von Polyphenolen, mit Fokus auf den Tanninen, leisten.

Folgende Zielstellungen und Hypothesen bilden das Grundgerüst dieser Dissertation und sollen durch die dargestellten Untersuchungsmethoden evaluiert werden:

1. Analyse der Auswirkungen von Tanninen auf die Lebensdauer, Stressresistenz und Fitness in *C. elegans*.

Hypothese: Tannine erhöhen Lebensdauer und Stressresistenz und zeigen adverse Effekte auf die Fitness.

Aufgrund der vielfach beschriebenen gesundheitsfördernden Effekte der Tannine und aufgrund mehrfach beschriebener Lebensdauer-modulierender Eigenschaften verschiedener Polyphenole, werden die hier vorgestellten Tannine die Lebensdauer in *C. elegans* signifikant verlängern. Da lebensverlängernde Maßnahmen meist mit einer erhöhten Stressresistenz einhergehen (Johnson et al., 1996, 2001, 2002; Benedetti et al., 2008), werden die potentesten Wirkkonzentrationen auch diesen Parameter merklich verbessern. Die Fitness hinsichtlich der Mobilität wird durch die alterungsverzögernde Wirkung der Tannine erhöht, wobei der energieaufwendige Prozess der Lebensverlängerung Einbußen im Wachstum und/oder der Reproduktion nach sich ziehen wird.

Methodik:

Lebensdauertests mit *C. elegans* und verschiedenen Tannin-Konzentrationen werden Aufschluss über die lebensverlängernde Kapazität geben. Die Stressresistenz wird anhand von thermischen und oxidativen Stresstests überprüft und zur Evaluierung der Fitness werden diverse Lebensparameter analysiert; dazu zählen das Wachstum, die Anzahl der Nachkommen, die pharyngeale Pumpfrequenz als auch die Mobilität.

2. Einschätzung der Relevanz von antioxidativen und antimikrobiellen Effekten auf die Lebensverlängerung.

Hypothese: Kaum Relevanz der antioxidativen und antimikrobiellen Effekte.

Wie bereits zuvor dargestellt, gibt es zahlreiche Berichte, die die antioxidative Kapazität der Polyphenole als singulären Erklärungsansatz überwiegend ausschließen und die prooxidative Effekte in Tanninen nachweisen konnten. Die antioxidative Kapazität der Tannine wird daher bei der Lebensverlängerung und Stressresistenz höchstens eine untergeordnete Rolle einnehmen.

Ebenso kommen antimikrobielle Effekte als Hauptauslöser nicht in Frage. Diese Hypothese wird von der Blaubeerpolyphenol-Studie (Wilson et al., 2006)

untermauert. Zudem wurde Polyphenol-induzierte Langlebigkeit auch in Mäusen erreicht, deren Nahrungsquelle nicht von Bakterien dominiert wird (Kitani et al., 2007), so dass hier antimikrobielle Effekte kaum Relevanz aufweisen.

Methodik:

Der gesamt-antioxidative Status der behandelten Tiere als auch der Einzelsubstanzen wird mittels TOSC-Analyse erfasst. Zudem wird die Lebensdauer von exponierten *mev-1*-Mutanten untersucht, welche hypersensitiv auf oxidativen Stress reagieren. Die Genexpressionsanalyse kann ferner Auskunft über potentielle Induktionen von Antioxidans-codierenden Genen geben. Letztlich kann die protektive Wirkung vor endogen entstehenden ROS (induziert durch thermischen Stress) und exogen zugeführten ROS (durch H₂O₂-Exposition) Hinweise auf antioxidative Aktivitäten geben. Um antibakterielle Effekte als Hintergrundmechanismus auszuschließen, werden zusätzlich Lebensdauertests mit abgetöteten Bakterien durchgeführt.

3. Überprüfung Tannin-induzierter Hormesis und CR.

Hypothese: Tannine wirken hormetisch und lösen einen CR-Effekt aus.

Die Toxizität von Tanninen als auch Hormesis-Effekte von Polyphenolen und Tanninen wurden bereits beschrieben. Die von den Testsubstanzen in dieser Arbeit induzierte Lebensverlängerung und Stressresistenz wird daher insbesondere in niederen Konzentrationen auftreten. Im Sinne des Hormesis-Effektes werden höhere Dosen weniger wirksam und schließlich sogar toxisch sein.

Antinutritive Effekte wurden häufig bei Tanninen und diversen Organismen festgestellt. Daher kann angenommen werden, dass Tannine einen CR-Effekt auslösen und auf diese Weise zur Langlebigkeit führen.

Methodik:

Um einen Hormesis-Effekt zu erkennen, werden die Lebensdauertests und Stressresistenztests mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Zusätzlich wird die Relevanz verschiedener Stress-regulierender Gene mit Hilfe von Mutantenstämmen überprüft. Nicht zuletzt werden Genexpressionsstudien mittels Microarray und qRT-PCR für die stärkste wirksame Substanz durchgeführt, um Induktionen von Stress-relevanten Genexpressionen zu detektieren.

Der Nachweis eines CR-Effektes wird auf verschiedenen Ebenen erfolgen. Um eine Reduktion der aufgenommenen Nahrung festzustellen, wird die pharyngeale Pumpfrequenz gemessen. Ein Attraktionstest liefert ferner Hinweise auf eine mögliche Vermeidung der tanninhaltigen Bakterien. Die potentielle Beteiligung des Gens *sir-2.1* wird mit Hilfe eines Mutantenstammes überprüft. Zudem werden Lebensdauertests unter CR-Bedingungen durchgeführt. Diese Bedingungen werden zum Teil bereits bei dem Lebensdauertest mit abgetöteten Bakterien erfüllt. Zur Absicherung wird zusätzlich noch die chronisch mangelernährte *eat-2*-Mutante untersucht. Nicht zuletzt werden auch Beeinträchtigungen des Wachstums, der Reproduktion und der Fettakkumulation Hinweise auf einen CR-Effekt liefern.

4. Analyse der molekularen Mechanismen, die zur Lebensverlängerung und Stressresistenz führen.

Hypothese: Spezifische Gene und Signalwege vermitteln die Tanninwirkung.

Gene, deren An- oder Abschaltung eine Verlängerung des Lebens hervorrufen können und/oder die eine Rolle in der Stressabwehr und im Detoxifizierungsmechanismus spielen, vermitteln die Tannin-induzierte Langlebigkeit und Stressresistenz. Untermuert wird diese Hypothese durch verschiedene Berichte, die die Korrelation von Polyphenolen und verschiedenen Genexpressionsmustern bzw. Signalkaskaden beschreiben.

Methodik:

Lebensdauer und Stressresistenz werden mit verschiedenen Mutantenstämmen überprüft, darunter befinden sich auch viele Stämme mit Genabschaltungen des IIS. Zudem wird der fluoreszierende DAF-16::GFP-Stamm eingesetzt, um eine potentielle Beeinflussung der DAF-16-Lokalisierung zu ermitteln. Letztlich wird die Untersuchung der Genexpression mittels Microarray und qRT-PCR weiteren Aufschluss über die Interaktion mit bestimmten Signalwegen ergeben.

5. Evaluierung der Alterungs-Theorien im Kontext der Tanninwirkungen.

Hypothese: Die Mitohormesis-Theorie, Xenohormesis-Hypothese, „Green Theory of Ageing“ und die „Disposable Soma Theory“ spiegeln sich in der Tanninwirkung wider.

Die „Free Radical Theory of Ageing“ als auch die erweiterten Theorien werden aufgrund der postulierten Irrelevanz der antioxidativen Tannin-Kapazität als Hintergrund der Lebensverlängerung ausgeschlossen. Aufgrund der beschriebenen toxischen und prooxidativen Wirkmechanismen von Tanninen erscheint nicht nur der Hormesis-Effekt plausibel, auch die Mitohormesis-Theorie wird sich in der Tannin-vermittelten Langlebigkeit widerspiegeln. Dies gilt ebenso für die Xenohormesis-Hypothese, da Tannine verstärkt unter Stress von der Pflanze gebildet werden. Die Aktivierung des Detoxifizierungssystems ist Teil des Hormesis-Effektes, so dass sich hiermit auch die „Green Theory of Ageing“ integrieren lässt. Die „Disposable Soma Theory“ bietet die energetische Erklärung für die Ankurbelung dieses Stressabwehrsystems und wird sich hier ebenfalls bestätigen. Die Mutations-Akkumulations-Theorie und die „Antagonistic Pleiotropy Theory“ sind für diese Untersuchung weniger relevant und können in diesem Rahmen nicht einbezogen werden.

Methodik:

Gesamtanalyse aller Ergebnisse dieser Arbeit und Integration relevanter Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen.

6. Feststellung von Wirk-Unterschieden zwischen den Tanninen und Vergleich mit anderen natürlichen Substanzen.

Hypothese: Jedes Tannin weist individuelle Wirkwege auf.

Aus der hohen Varianz an phänotypischen Auswirkungen und molekularbiologischen Mechanismen, die bislang mit diversen Polyphenolen assoziiert worden sind, kann geschlossen werden, dass Polyphenole sehr individuelle Substanzen mit spezifischen Wirkprinzipien sind. Obwohl einige Überschneidungen bei der phänotypischen Wirkausprägung zu erwarten sind, werden die zugrundeliegenden Mechanismen jedoch spezifisch einem Tannin zuzuordnen sein. Dieses Prinzip wird sich auch bei einem Vergleich zu anderen natürlichen Substanzen wiederfinden lassen.

Methodik:

Gesamtanalyse aller Ergebnisse dieser Arbeit und Vergleich der phänotypischen Auswirkungen und molekularbiologischen Mechanismen innerhalb der untersuchten Tannine als auch zu in der Literatur beschriebenen Naturstoff-Studien.

2 Experimentelle Durchführung

2.1 *C. elegans*- und *E. coli*-Kultivierung

Alle *C. elegans*-Stämme wurden, sofern nicht anders angegeben, bei 20°C auf NGM- (Nematode Growth Medium) Agarplatten gehalten und mit dem *Escherichia coli*-Stamm OP50 gefüttert. Nähere Angaben hierzu sind Brenner (1974) zu entnehmen. Der Wildtyp-Stamm N2 (Variante Bristol) und die Mutantenstämme AE501, *nhr-8(ok186)*; AM1, *osr-1(rm1)*; AU1, *sek-1(ag1)*; DA465, *eat-2(ad465)*; DR1567, *daf-2(m577)*; DR20, *daf-12(m20)*; EU1, *skn-1(zu67)*; GR1307, *daf-16(mgDf50)*; MT2605, *unc-43(n498n1186)*; RB1679, *cav-1(ok2089)*; RB1749, *numr-1(ok2239)*; TJ356, *daf-16::daf-16-gfp;rol-6 (zIs356)*, TJ1052, *age-1(hx546)*; TK22, *mev-1(kn1)*; VC199, *sir-2.1(ok434)*; VC204, *akt-2(ok393)*; VC8, *jnk-1(gk7)* sowie der OP50-Stamm wurden vom „Caenorhabditis Genetics Centre, University of Minnesota“ bezogen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird im weiteren Verlauf nur der Gen-Name verwendet und auf die Bezeichnung des Allels und des Stammes verzichtet. Zur Auszählung, Selektion und Beobachtung der Tiere wurde ein Stereomikroskop (Nikon SMZ 645, Nikon, Düsseldorf) verwendet. Standardisierte Methoden, wie das Einfrieren der Nematoden zur langfristigen Aufbewahrung als auch die Reinigung mittels Hypochlorid zur Eliminierung von Kontaminationen sind Brenner (1974), Lewis & Fleming (1995) als auch Stiernagle (2006) zu entnehmen.

2.2 Exposition mit den Testsubstanzen

Die Testsubstanzen Tanninsäure, Gallussäure, Ellagsäure und (±)-Catechin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden sowohl dem NGM-Medium als auch den OP50-Futterbakterien zugegeben. Die Endkonzentration lag zwischen 25 und 800 µM und ist jeweils an entsprechender Stelle angegeben. Für kleine Platten (Ø 35 mm) wurden 100 µl und für große Platten (Ø 96 mm) 1000 µl Bakterien eingesetzt. Dimethylsulfoxid (DMSO, Applichem, Darmstadt) diente als Lösungsmittel und wurde mit einer Endkonzentration von 0,3% (v/v) allen Platten und Bakterien in gleichem Maße zugefügt. Kontrollplatten enthielten nur die erforderliche Menge an DMSO.

2.3 Untersuchung von Lebensparametern

2.3.1 Lebensdauertest

Je 30 L4-Larven, die anhand eines weißen Flecks in der Körpermitte gut zu erkennen sind, wurden mit Hilfe eines Platindrahtes auf je eine große Agarplatte (Ø 96 mm) transferiert, welche bereits die zu untersuchende Konzentration der Testsubstanz

enthielt. Drei bis vier Tage darauf wurden L4-Larven der Folgegeneration (F1-Generation) auf kleine Platten mit ca. 15 Tieren pro Platte überführt. Während der reproduktiven Phase wurden die adulten Tiere täglich auf neue Platten transferiert, um das Verhungern der Tiere zu verhindern und um die adulten Tiere von der F2-Generation zu trennen. Danach war ein Umsetzen der Nematoden alle drei Tage ausreichend. Lebende und tote Tiere wurden täglich ab dem ersten Adult-Tag, welcher bereits einen Tag nach dem Transferieren der L4-Larven erreicht wird, gezählt, bis alle Individuen gestorben sind. Nematoden, die auch nach Berührung mit dem Platindraht reglos blieben, wurden als tot gewertet. Tiere, die „internal hatch“ aufwiesen („Inneres Schlüpfen“; ein Defekt in der Eiablage, bei dem die Larven in dem adulten Tier heranwachsen und letztlich zu seinem Tod führen) oder die den NGM-Agar verlassen hatten wurden „zensiert“, das heißt vom Ergebnis ausgeschlossen. Die Substanzen wurden zunächst in drei Konzentrationen (100 μ M, 200 μ M und 300 μ M) zuzüglich Kontrolle (0 μ M) getestet. Zur Ermittlung der effektivsten Konzentration und zum Nachweis eines Hormesis-Effektes wurden weitere Konzentrationen nach Auswertung der ersten Ergebnisse selektiert.

Um zu überprüfen, ob antimikrobielle Effekte der Grund für eine beobachtete Lebensverlängerung sind, wurden Lebensdauertests auch mit hitzegetöteten OP50-Bakterien (30 Minuten bei 65°C) entsprechend Gruber et al. (2007) durchgeführt. Das Risiko einer Fremdkontamination wurde durch Zugabe von 50 mg/ml Ampicillin zum NGM-Medium reduziert. Im Zuge dieser Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass Nematoden unter diesen Voraussetzungen häufig die Agarplatte verlassen und besonders oft von „internal hatch“ betroffen sind. Um diesen unerwünschten Effekt zu reduzieren, wurden die Tiere zunächst mit lebenden Bakterien gefüttert und erst am 6. Adult-Tag auf Platten mit hitzegetöteten Bakterien transferiert.

Weitere Protokoll-Abweichungen und Varianten des Lebensdauertests werden an entsprechender Stelle beschrieben.

2.3.2 Thermischer und oxidativer Stresstest

L4-Larven der F1-Generation wurden auf kleine Platten mit je ca. 25 Tieren pro NGM-Platte transferiert und regelmäßig umgesetzt. Am 6. Adult-Tag wurden die Tiere entweder für 8 Stunden bei 35°C temperiert (Thermischer Stresstest) oder für ebenfalls 8 Stunden in ein Flüssigmedium bestehend aus M9-Puffer (Brenner, 1974) und 0,8 mM Hydrogenperoxid (Oxidativer Stresstest) gegeben. Nachfolgend wurden tote und lebende Tiere gezählt. Die angegebenen Zeiten wurden für einige Mutantenstämme, die eine veränderte Stressresistenz im Vergleich zum Wildtyp aufweisen, verändert. So konnte sicher gestellt werden, dass nicht alle Tiere nach Ablauf der Zeit gestorben sind bzw. die Sterbephase noch nicht begonnen hatte. Hinweise zu den veränderten Inkubationszeiten befinden sich an entsprechender Stelle.

2.3.3 Larvale und adulte Entwicklung des Längenwachstums

Die Länge der Individuen wurde mit Hilfe eines Mikroskops und eines kalibrierten Okulars im Anschluss an die Tötung der Tiere bei 45°C für zweieinhalb Stunden vermessen. Die erste experimentelle Durchführung wurde mit Nematoden der F1-Generation am 6. Adult-Tag vorgenommen. Diese Messung berücksichtigt nur die Entwicklungsveränderungen während der Adult-Phase, da die Tiere hier synchron im L4-Stadium selektiert wurden. Um auch die Wachstums-Variationen während der larvalen und jungadulten Entwicklung zu analysieren, wurden die Nematoden zusätzlich an mehreren Tagen dieser Entwicklungsperiode ausgemessen. Hierzu wurden Nematoden der P-Generation am 2. Adult-Tag für zwei Stunden auf frische Testplatten transferiert und daraufhin wieder entfernt. Die gelegten Eier (F1-Generation) wurden bei 20°C inkubiert und an den folgenden sieben Tagen wurden je 60 der Tiere nach oben genannter Methode vermessen.

2.3.4 Reproduktionstest

L4-Larven der F1-Generation wurden einzeln auf 10 kleine Testplatten transferiert und täglich auf frische Platten umgesetzt, bis die Reproduktionsphase beendet war. Die Nachkommen jedes Tieres wurden im L2- oder L3-Stadium ausgezählt. Zudem wurde der Zeitpunkt der ersten Eiablage festgestellt. Dazu wurden Tiere der P-Generation am 2. Adult-Tag für eine halbe Stunde auf Testplatten gesetzt und wieder entfernt. Der Zeitpunkt (t_0) wurde notiert. Die Nachkommen wurden zwei Tage später einzeln auf 20 kleine Platten transferiert. Nach Erreichen des L4-Stadiums wurden die Tiere stündlich beobachtet und der Zeitpunkt der ersten Eiablage notiert. Zusätzlich wurde die Anzahl der Nachkommen nach 85 Stunden ab t_0 ausgezählt.

2.3.5 Qualitativer Mobilitätstest

Tiere der F1-Generation wurden am 6. und 9. Adult-Tag 25 bzw. 30 Sekunden auf frische Testplatten gesetzt und wieder entfernt. Die Tiere hinterließen dabei eine gut zu erkennende Kriechspur im Bakterienrasen. Alle gerade verlaufenden Spuren wurden daraufhin am Mikroskop mit Hilfe eines kalibrierten Okulars vermessen und die zurückgelegte Strecke notiert. Pro Konzentration wurden dabei 30 Spuren vermessen.

2.3.6 Quantitativer Mobilitätstest

Um zu ermitteln, wie viele Tiere einer Expositionsgruppe mobil sind, wurde ein quantitativer Mobilitätstest durchgeführt. Hierfür wurden pro Konzentration je 100 Tiere der F1-Generation auf 10 Platten am 6., 9., 12., 15., 18. und 21. Adult-Tag für 15 Sekunden beobachtet. Der Anteil an Tieren, die sich spontan innerhalb dieses Zeitraumes fortbewegten, wurde notiert. Die übrigen Tiere wurden dann mit Hilfe des Platindrahtes zur Bewegung angeregt, um eventuell gestorbene Tiere zu entdecken und von der Platte zu entfernen. Tote und „internal hatch“-aufweisende Tiere wurden von der Bewertung ausgeschlossen.

2.3.7 Attraktionstest

Auf einer großen NGM-Platte wurden sechs gleichgroße Bakterientropfen ($OD_{595}=5,0$) kreisförmig und in gleichem Abstand verteilt. Jeder zweite Tropfen enthielt die zu untersuchende Substanz, die übrigen dienten zur Kontrolle und wurden nur mit DMSO angefertigt. Nach Lufttrocknung wurde jeweils eine unbehandelte L1-Larve pro Tropfen transferiert. Die Platten wurden bei 20°C für 96 Stunden inkubiert und die Nachkommen pro Bakterientropfen ausgezählt. Die Nachkommen der drei Kontrollen wurden zusammengefasst und als 100% festgesetzt. Die Summe der Nachkommen auf den substanzhaltigen Bakterien wurde dazu in Relation gesetzt.

2.3.8 Pharynx-Pumpfrequenz

Am 3., 6. und 9. Adult-Tag wurde die pharyngeale Pumpfrequenz erfasst. Hierfür wurden pro Konzentration und Zeitpunkt 10 Nematoden der F1-Generation jeweils dreimal für 15 Sekunden mit starker Vergrößerung beobachtet. Die Pumpfrequenz wurde dabei gezählt und notiert.

2.3.9 Auswertung und statistische Analyse

Für die Lebensdauertests mit den Mutantenstämmen wurde die mediane (50% der Tiere gestorben) und die mittlere (Summe aller Lebensdauern geteilt durch die Anzahl der Tiere) Lebensdauer sowie die jeweilige prozentuale Veränderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ermittelt. Für die Wildtyp-Lebensdauertests wurde zusätzlich die minimale (10% der Tiere gestorben) und die maximale (90% der Tiere gestorben) Lebensdauer bestimmt, um eine detailliertere Aussage zum Wirkprinzip zu treffen. Die statistische Signifikanz für Unterschiede in der mittleren Lebensdauer wurde mit Hilfe des Log-Rank-Tests errechnet (Bioinformatics at the Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research; <http://bioinf.wehi.edu.au/software/russell/logrank>).

Mittlere Überlebensraten und prozentuale Veränderungen in Bezug zur Kontrolle wurden für den thermischen und oxidativen Stresstest ermittelt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests (Sigma Stat 3.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kalkuliert. Für den quantitativen Mobilitätstest wurde der Anteil an Tieren mit Spontanbewegungen gegenüber Nicht-Spontanbewegungen ermittelt. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden jeweils mit dem Chi-Quadrat-Test ermittelt. Für die Auswertung der Reproduktionsleistung, der Körperlänge, der Fortbewegung, des Attraktionsverhaltens und der pharyngealen Pumpfrequenz wurde die statistische Signifikanz anhand des One Way ANOVA Tests (Sigma Stat 3.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) errechnet.

2.4 Molekularbiologische und funktionelle Untersuchungen

2.4.1 TOSC-Analyse

Zur Bestimmung der relativen antioxidativen Kapazität mittels TOSC- (Total Oxidant Scavenging Capacity) Analyse, wurden zunächst pro Messung und Substanz drei große Agarplatten mit jeweils 35 L4-Larven angesetzt. Jede Substanz wurde dabei in der effektivsten Konzentration, bezogen auf die Lebensdauer, untersucht. Nach vier Tagen befanden sich hauptsächlich jungadulte Tiere der F1-Generation auf den Platten. Sie wurden mit M9-Puffer abgespült und in gekühlten 15 ml Plastikröhrchen gesammelt. Die Röhrchen wurden im Eis belassen, bis sich die Tiere am Boden abgesetzt hatten. Der Überstand wurde entfernt und mit frischem M9-Puffer ersetzt. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Beim letzten Waschvorgang wurden die Röhrchen für eine Minute bei 200 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und die Pellets in je ein Aufschlussröhrchen (innuSPEED Lysis Tube C, Analytik Jena, Jena) überführt und sechsmal für 30 Sekunden mit einem Homogenisator (Speedmill P12, Analytik Jena, Jena) homogenisiert. Um ein Überhitzen der Proben zu vermeiden, wurden die Proben zwischen den Homogenisierungsschritten jeweils 4 Minuten auf Eis abgekühlt. Das Homogenat wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 10 Minuten bei 3000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Jeweils 20 µl wurden zur Bestimmung des Proteingehalts entnommen, welche mit Hilfe des Bradford-Reagens (Sigma Aldrich, Taufkirchen) nach mitgelieferter Vorschrift durchgeführt wurde. Die übrige Menge wurde entweder direkt zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität von wasserlöslichen Stoffen verwendet oder zur Extraktion der lipidlöslichen Substanzen basierend auf Bligh & Dyer (1959) weiter verarbeitet. Die Probe wurde dazu mit M9-Puffer auf 400 µl aufgefüllt und mit 500 µl Dichlormethan und 1000 µl Methanol versetzt. Nachdem für 10 Minuten kräftig gevortext wurde, wurde die Probe über Nacht bei 4°C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden je 500 µl M9-Puffer und Dichlormethan zugefügt, erneut für 10 Minuten gevortext und bei 3000 g und 4°C zentrifugiert. Die untere Phase wurde schließlich zur Messung der antioxidativen Kapazität verwendet.

Die relative Quantifizierung der Antioxidantien erfolgte durch Photochemolumineszenz mit dem PHOTOCHEM® (Analytik Jena, Jena). Diese Apparatur regt die Bildung von Superoxidanionradikalen mit Hilfe einer Photosensitizer-Substanz photochemisch an. Die Radikale, die nicht durch die Probe eliminiert werden, werden luminometrisch über Luminol quantifiziert. Die Ergebnisse werden nach entsprechender Kalibrationskurve in äquivalenten Konzentrationseinheiten zur Ascorbinsäure (für wasserlösliche Proben) oder Trolox (synthetisches Vitamin E, für lipidlösliche Proben) angegeben. Die Durchführung erfolgte anhand des Protokolls ACW-Kit (antioxidative Kapazität wasserlöslicher Stoffe) bzw. ACL-Kit (antioxidative Kapazität lipidlöslicher Stoffe) (Analytik Jena, Jena).

Zur Messung der antioxidativen Kapazität der Tannine selbst wurden diese in DMSO gelöst und direkt mit Hilfe des ACW-Kits analysiert.

Die statistische Signifikanz wurde anhand des One Way ANOVA Tests (Sigma Stat 3.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ermittelt.

2.4.2 Bestimmung der DAF-16-Translokation

Um die Translokation von DAF-16 in den Nukleus sichtbar zu machen, wurde der *daf-16::daf-16-gfp;rol-6*-Stamm TJ356 verwendet. Das grün fluoreszierende Protein GFP ist dabei an das Protein DAF-16 gekoppelt und kann unter einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Unbehandelte L4-Larven wurden dazu auf substanzhaltige und Kontrollplatten transferiert. Die Tiere wurden täglich auf frische Platten gesetzt und zweimal täglich in den darauffolgenden sechs Tagen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse E200) beobachtet. Befindet sich DAF-16 vorwiegend im Cytosol, so erscheint die grüne Fluoreszenz diffus und im gesamten Tier verteilt. Hat jedoch eine Translokation in den Nukleus stattgefunden, so erscheint die Fluoreszenz punktförmig und stark abgegrenzt. Als Positiv-Kontrolle dienten unbehandelte Tiere des Stammes, die für zwei Stunden bei 35°C inkubiert worden sind. Die Beobachtungen wurden notiert und exemplarisch mit einer Kamera (Canon Powershot A95) festgehalten. Unterschieden wurde dabei optisch zwischen stattgefundener Translokation, Nicht-Translokation und einem intermediärem Typ (sowohl punktförmige als auch diffuse Fluoreszenz).

2.4.3 Gesamtgenomischer Microarray

Aus den untersuchten Substanzen wurde Tanninsäure als die effektivste Substanz, bezogen auf die lebensverlängernde Eigenschaft, ausgewählt. Um differentiell exprimierte Gene ausfindig zu machen, wurde mit Hilfe eines Gesamtgenomischen Microarrays ein Genexpressionsprofil der TS erstellt. Das Affymetrix-Microarray-System wurde hierfür aufgrund seiner hohen Zuverlässigkeit und guten Handhabung ausgewählt.

Zur Vorbereitung wurden drei große Platten mit Nematoden herangezüchtet. Die Tiere wurden im jungen Adult-Stadium mit M9-Puffer abgespült und in Plastikröhrchen für 2 Minuten bei 2500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 1 ml entnommen und 10 ml Bleich-Lösung (Stiernagle, 2006) zugefügt. Nach 4-minütigem, starkem Schütteln wurde 1 Minute bei 2500 g zentrifugiert. Nach Entnahme des Überstandes wurde noch dreimal mit M9-Puffer gewaschen. Die erhaltenen Eier wurden schließlich über Nacht in 10 ml M9-Puffer über Kopf rotiert. Durch den Nahrungsmangel schlüpfen die Tiere zwar, entwickeln sich jedoch nicht weiter, so dass eine synchrone Kultur erhalten wurde. Nach kurzer Zentrifugation wurde am darauffolgenden Tag ein Großteil des Überstandes entnommen. Die Tiere wurden schließlich in kleinen Aliquots ausgezählt. Je eine große Platte pro Konzentration (0 µM, 100 µM, 200 µM und 300 µM) wurde mit 3000 Nematoden bestückt. Am 2. Adult-Tag wurden die Tiere abgespült und die synchrone F1-

Generation nach soeben dargestellter Methode geerntet. Eine große Platte pro Konzentration wurde erneut mit 3000 Nematoden versehen, die bis zum 1. Adult-Tag auf den Platten verblieben und daraufhin abgespült wurden. Insgesamt wurden drei Proben pro Konzentration generiert.

Die RNA wurde mit Hilfe des Tri-Reagenz (zur Durchführung siehe Molecular Research Center, Inc., 1995) isoliert und mit einem Spektralphotometer (NanoDrop ND-1000 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) quantifiziert. Die RNA wurde anschließend mit dem „MessageAmp Premier RNA Amplification Kit“ (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX, USA) weiter verarbeitet. Dieser Kit umfasst die cDNA-Synthese mit darauffolgender cDNA-Doppelstrangsynthese, die Amplifikation der cRNA unter Einbau Biotin-markiertem UTP, einen Reinigungsschritt sowie die Fragmentierung der RNA. Die Menge der RNA wurde erneut mit dem NanoDrop analysiert und die erfolgreiche Fragmentierung mit dem Bioanalyser (2100 Bioanalyser, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) evaluiert. Zur Vorbereitung auf die Hybridisierung wurde der „GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit“ und die Vorschrift „GeneChip® Expression Analysis Technical Manual“ (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) verwendet. Die Hybridisierung fand im „Hybridization Oven 640“ (Affymetrix) und das Waschen sowie das Anfärben der biotinylierten Fragmente mit Streptavidin-Phycoerythrin in der „GeneChip® Fluidics Station 450“ (Affymetrix) statt. Nach dem Scannen bei 570 nm (GeneChip Scanner 3000 7G System, Affymetrix) konnten die Daten analysiert und bearbeitet werden.

Der *C. elegans*-Affymetrix-Microarray umfasst mehr als 22.500 Transkripte, wobei jedes durch elf verschiedene, 25 Basen lange Oligonukleotide repräsentiert wird. Zu jedem perfekt passendem Oligonukleotid existiert auch ein nicht passendes, welches einen Basenaustausch aufweist. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Dr. Suresh Swain am King's College London. Die Analyse der Daten umfasste die Kalkulation des Hintergrundes inklusive der Einbeziehung der falsch gepaarten Hybride sowie die Normalisierung der Daten (CARMAweb 1.4: <https://carmaweb.genome.tugraz.at/carma/>). Zudem wurden die drei biologischen Wiederholungen zusammengefasst und statistische Analysen mittels One Way ANOVA, t-Test und SAM-Test (Significance Analysis of Microarray) (GEPAS Software, <http://www.gepas.org>) zur Ermittlung von signifikanten Genexpressionsunterschieden ($p < 0,05$) durchgeführt. Mit Hilfe des SAM-Tests wurde auch die FDR (False Discovery Rate) ermittelt und das nicht-stringente Level auf $< 12,5\%$ festgesetzt. Schließlich wurde eine GO-(Gene Ontology bzw. Gen-Ontologie) Analyse mit Genen durchgeführt, die mindestens eine 1,25-fache veränderte Expression aufwiesen (GoMiner software, <http://discover.nci.nih.gov/gominer/index.jsp>).

2.4.4 Quantitative RT-PCR

Acht Gene wurden mit Hilfe des durchgeführten Microarrays zur weiteren Überprüfung mittels qRT-PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction) ausgewählt. Es wurden drei Konzentrationen (0, 100 und 200 μM) TS an jeweils drei Zeitpunkten (3., 6. und 10. Adult-Tag) getestet, wobei je drei unabhängige Ansätze angefertigt wurden. Zur Vorbereitung auf die qRT-PCR wurden pro Ansatz 500 Nematoden der F1-Generation benötigt. Diese Tiere wurden jeweils auf einer großen Platte gehalten und regelmäßig auf frische Platten transferiert. Am jeweiligen Testzeitpunkt wurden die Tiere einer Platte in 1,5 ml kalten M9-Puffer mit Hilfe eines Platindrahtes transferiert. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und nach Entnahme des M9-Puffers wurden 100 μl RA1-Puffer (Lysis-Puffer, Macherey-Nagel, Düren) hinzugefügt. Die Proben wurden zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Proben, wie bereits zuvor unter 2.4.1 beschrieben, homogenisiert. Die RNA-Isolation erfolgte mit dem „Nucleo Spin RNA II Kit“ (Macherey-Nagel, Düren) nach mitgelieferter Vorschrift. Dieses Protokoll enthält auch einen DNase-Schritt zur Eliminierung potentiell störender DNA. 1 μl des erhaltenen Eluats wurde schließlich zur Bestimmung der RNA-Konzentration eingesetzt. Dazu wurde die OD (Optische Dichte) bei 260 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers (Techne SpecGene, Cambridge, UK) gemessen und die RNA-Konzentration in ng/ μl errechnet. Um die Qualität der RNA zu überprüfen und um eine Degradation auszuschließen, wurden zusätzlich 2 μl der Probe elektrophoretisch mit einem Ethidiumbromid-haltigen, 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt und unter UV-Licht betrachtet. Die charakteristische Doppelbande der rRNA ist dabei Maß für die Qualität der gesamten RNA. Die Proben wurden schließlich bei -80°C gelagert.

Am darauffolgenden Tag wurden 10 μl der RNA (1-5 μg) mit Hilfe der M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverse Transkriptase (Promega, Madison, WI, USA) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde die RNA mit 0,8 μl einer Oligonukleotid-Mischung (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Promega) für 5 Minuten bei 70°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 3 μl RT-Puffer (fünffach-konzentriert, Promega), 0,8 μl dNTPs (10 mM) und 0,4 μl M-MLV-Revertase hinzugefügt, für 90 Minuten bei 42°C inkubiert und die Reaktion bei 94°C für 4 Minuten gestoppt. Nach Abkühlung konnten die Proben nun zur qRT-PCR eingesetzt werden.

Die Primersequenzen für die acht Gene sowie für das Referenzgen β -Actin (*act-1*) wurden mit Hilfe des Programms Clone Manager Suite 7 (Scientific & Educational Software, Cary, NC, USA) zuvor ausgewählt und befinden sich in **Tabelle A1** (Anhang). Der qRT-PCR-Mix wurde mit dem „qPCR Green Core Kit“ (Jena Bioscience, Jena) nach Vorschrift angefertigt. Dieser enthält neben einer thermisch-sensitiven „hot-start“ Polymerase und den Nukleotiden dATP, dCTP, dGTP und dUTP auch einen Puffer mit dem fluoreszierenden Farbstoff EvaGreen, welcher während des Amplifikationsprozesses in die DNA eingebaut wird. Die Amplifikation und die Intensitätsmessung erfolgte mit dem BIORAD MyiQ iCycler

(BIORAD, München) und die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten wurden auf *act-1* normalisiert (Bio-Rad IQ5, BIORAD). Die statistische Signifikanz wurde schließlich mit Hilfe des One Way Anova Tests (Sigma Stat 3.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) errechnet.

2.4.5 Bestimmung des Triglyzerid-Gehalts

Jede Substanz wurde in ihrer effektivsten Konzentration, bezogen auf die Lebensdauer, überprüft. Die Tiere wurden, wie unter 2.4.3 beschrieben, kultiviert und synchronisiert. Nach erfolgter Homogenisierung (siehe 2.4.1) wurden die Triglyzeride in den Proben enzymatisch mit Hilfe des „Serum Triglyceride Determination Kits“ (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) nach beiliegender Produktinformation hydrolysiert. Die Vorschrift enthält auch eine Färbereaktion, die am Spektralphotometer bei 540 nm quantifiziert werden kann. Die Absorption ist dabei proportional zum Triglyzeridgehalt der Probe. Der wahre Triglyzeridgehalt berechnet sich aus dem Gesamt-Triglyzeridgehalt abzüglich des freien Glyzerolgehaltes. Der Proteingehalt jeder Probe wurde zudem mit Hilfe des Bradford-Reagens (Sigma Aldrich, Taufkirchen) nach mitgelieferter Vorschrift bestimmt und mit dem Triglyzeridgehalt verrechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe von One Way ANOVA (Sigma Stat 3.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Effektive Modulation der Lebensdauer von *C. elegans* durch Tannine

Tanninsäure, Gallussäure, Ellagsäure und Catechin wurden zunächst in je drei Konzentrationen (100, 200 und 300 μM) bei 20°C auf Lebensdauer-modulierende Eigenschaften in *C. elegans* getestet. Weitere Konzentrationen wurden anschließend ausgewählt, um potentielle toxische Effekte zu detektieren oder um möglicherweise stärkere lebensverlängernde Eigenschaften festzustellen. Die jeweils potenteste lebensverlängernde Konzentration wurde schließlich selektiert, um die Wirkung auch bei 15°C und 23°C zu überprüfen. Um zu analysieren, ob die lebensverlängernde Eigenschaft hauptsächlich in der Entwicklungs- und Reproduktionsphase initiiert wird, wurde die Lebensdauer auch in Tieren bestimmt, die nur bis zum 6. Adult-Tag einer Tannin-Exposition ausgesetzt waren. Zudem sollten zwei weitere Szenarien Aufschluss über einen potentiellen Transgenerationseffekt geben. Hierfür wurden die Tiere der Generation P und F1 mit den Tanninen exponiert und die Lebensdauer der F2-Generation zum Einen unter weiterer Tannin-Einwirkung und zum Anderen ohne weitere Tannin-Behandlung beobachtet.

Abbildung 5 bietet einen Überblick über die Abhängigkeit der mittleren Lebensdauer von der eingesetzten Konzentration der Tannine. Gallussäure und Catechin zeigten eine recht konstante Lebensverlängerung in allen getesteten Konzentrationen. Nur 300 μM GS erwirkte eine markant stärkere Lebensverlängerung als die anderen GS-Konzentrationen. Im Gegensatz dazu sind die Dosis-Wirkungs-Kurven der Tanninsäure und Ellagsäure eher J-förmig mit toxischem Potential bei höheren Konzentrationen, wobei TS insgesamt die stärkste Lebensverlängerung erreichen konnte.

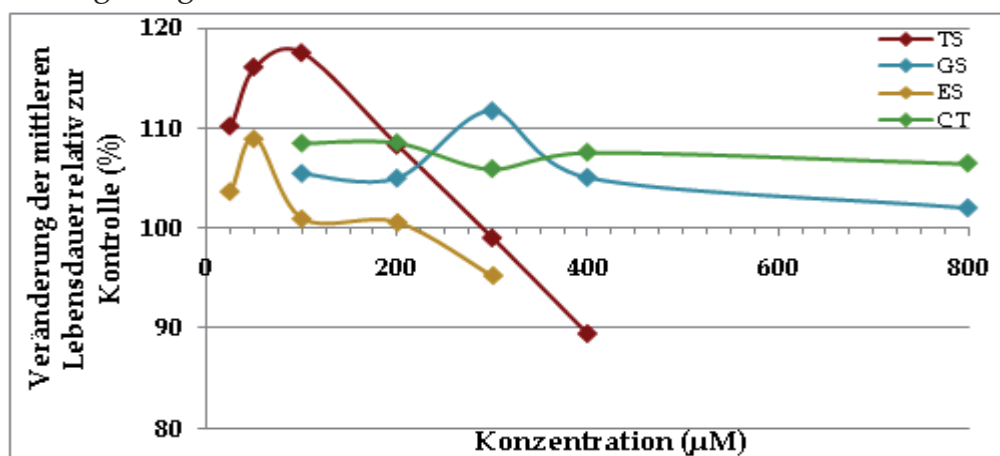


Abb. 5: Dosis-Wirkungs-Kurven der vier Tannine

Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen der mittleren Lebensdauer im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100%) unter Einsatz verschiedener Tannin-Konzentrationen. Die Versuche fanden bei 20°C statt und jeder Wert entspricht dem Durchschnitt von zwei bis sechs Experimenten. Angaben zur Signifikanz und zu Standardfehlern befinden sich in den Tabellen 1-4.

Die effektivste Konzentration der Tanninsäure (100 μM) führte zu einem Anstieg der mittleren Lebensdauer von rund 18% bzw. 20% bei 20°C bzw. 15°C (**Tab. 1**). Interessanterweise ist dieser Effekt bei 23°C mit über 47% noch wesentlich stärker ausgeprägt (**Tab. 1**). 300 μM TS führte in einem Einzelversuch zu einer signifikanten Lebensverkürzung, dieser Effekt ist bei 400 μM jedoch robuster (Anhang **Tab. A2; Tab. 1**). Die Wirkung von 100 μM TS scheint sich insbesondere in jungen Tieren zu entfalten, da die minimale Lebensdauer (Zeitpunkt, an dem noch 90% der Tiere leben) im Vergleich zur maximalen Lebensdauer (Zeitpunkt, an dem noch 10% der Tiere leben) bei allen Temperaturen wesentlich stärker profitiert. Es erscheint daher durchaus möglich, dass TS durch Beeinflussung der Larvalentwicklung oder der Reproduktionsphase die Lebensverlängerung hervorruft. In **Tabelle 1** ist ersichtlich, dass die TS-Exposition nur bis zum 6. Adult-Tag tatsächlich zu einer Verlängerung der mittleren Lebensdauer um rund 8% führte. Dies ist jedoch wesentlich geringer im Vergleich zur lebenslänglichen TS-Exposition mit rund 18%.

Das Konzentrations-Optimum bezüglich der Lebensdauer zeigte Gallussäure im Bereich von 300 μM . Hier konnte eine Verlängerung der mittleren Lebensdauer um 6% (15°C), 12% (20°C) und 19% (23°C) erlangt werden, wobei erneut die Effektivität mit zunehmender Temperatur stieg (**Tab. 2**). Die Betrachtung der minimalen, medianen und maximalen Lebensdauer lässt erkennen, dass GS keine Tendenz zur Beeinflussung einer bestimmten Lebensphase aufwies. Die Exposition nur bis zum 6. Adult-Tag erwies sich folglich auch als nicht ausreichend, wobei jedoch beide Versuche eine geringfügige, nicht signifikante Steigerung der Lebensdauer erbrachten (Anhang **Tab. A3**). Weitere Unterschiede zur TS finden sich im Vergleich der höheren Konzentrationen. Selbst bei 800 μM GS ist keinerlei toxisches Potential ersichtlich, jedoch auch keine signifikante Lebensverlängerung.

Ellagsäure zeichnet sich durch einen besonders kleinen lebensverlängernden Konzentrationsbereich aus. Nur 50 μM ES konnte zu einer signifikanten Lebensverlängerung von rund 9% bei 20°C und rund 8% bei 23°C führen (**Tab. 3**). Bei 15°C und bei Expositions-Stopp am 6. Adult-Tag konnte kein signifikanter Effekt beobachtet werden. 200 μM ES konnte in einem einzelnen Versuch eine signifikante Lebensverlängerung hervorrufen (Anhang **Tab. A4**), jedoch konnte in der Summe aller Ansätze keine signifikante Variation erlangt werden (**Tab. 3**). 300 μM ES zeigte indes ein ausgeprägt toxisches Potential.

Catechin bewirkte als einziges Tannin in allen getesteten Konzentrationen einen signifikanten Anstieg der mittleren Lebensdauer bei 20°C (**Tab. 4**), wobei 200 μM CT die Konzentration mit den besten Ergebnissen war. Die lebensverlängernde Eigenschaft konnte auch bei 15°C und 23°C beobachtet werden, eine Exposition bis zum 6. Adult-Tag mit einer anschließenden CT-freien Ernährung erlangte jedoch nur in einem Einzelversuch (Anhang **Tab. A5**) eine leichte, aber nicht signifikante Lebensverlängerung. Im Mittel konnte jedoch keine relevante Steigerung der Lebensdauer festgestellt werden.

Tabelle 1: Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Tanninsäure

Kondition	Minimale Lebensdauer [Tg] \pm SEM		Variation [%] \pm SEM		Mediane Lebensdauer [Tg] \pm SEM		Variation [%] \pm SEM		Maximale Lebensdauer [Tg] \pm SEM		Variation [%] \pm SEM		Mittlere Lebensdauer [Tg] \pm SEM		Variation [%] \pm SEM		n K/TS		n Ver-suche	
	K	TS	K	TS	K	TS	K	TS	K	TS	K	TS	K	TS	K	TS	K	TS	K	TS
15°C	100 μ M	12,69 \pm 1,68	16,91 \pm 0,52	135,03 \pm 13,74	20,89 \pm 1,06	24,52 \pm 0,43	117,58 \pm 3,86	26,09 \pm 0,54	30,43 \pm 0,04	116,69 \pm 2,30	20,50 \pm 1,25	24,60 \pm 0,32	120,36**	188/202	2					
		9,97 \pm 0,28	9,36 \pm 0,13	94,03 \pm 1,47	15,35 \pm 0,52	16,53 \pm 0,18	107,95 \pm 4,57	21,31 \pm 0,86	25,39 \pm 0,78	119,44 \pm 5,25	15,92 \pm 0,48	17,52 \pm 0,04	110,26**	308/293	3					
		9,97 \pm 0,28	11,10 \pm 0,54	111,25 \pm 2,55	15,35 \pm 0,52	18,00 \pm 0,20	117,47 \pm 3,32	21,31 \pm 0,86	24,70 \pm 0,49	116,47 \pm 6,77	15,92 \pm 0,48	18,46 \pm 0,06	116,17**	308/311	3					
		9,22 \pm 0,47	12,07 \pm 0,80	131,32 \pm 6,94	15,42 \pm 0,84	18,08 \pm 0,84	117,64 \pm 2,44	22,17 \pm 0,72	24,22 \pm 0,73	109,45 \pm 2,41	16,04 \pm 0,58	18,86 \pm 0,86	117,60**	747/746	6					
20°C	200 μ M	9,48 \pm 0,24	11,20 \pm 1,01	118,35 \pm 11,15	14,46 \pm 0,45	16,08 \pm 1,99	110,66 \pm 11,05	21,01 \pm 1,17	21,91 \pm 1,04	104,38 \pm 1,03	15,48 \pm 0,52	16,83 \pm 1,42	108,35**	339/351	3					
		9,27 \pm 0,37	8,94 \pm 0,45	97,13 \pm 8,66	13,76 \pm 0,64	14,06 \pm 1,16	102,16 \pm 6,93	19,90 \pm 0,15	19,82 \pm 1,20	99,72 \pm 6,79	14,69 \pm 0,43	14,55 \pm 0,77	99,08	355/308	3					
		9,81 \pm 0,44	7,82 \pm 0,19	80,27 \pm 5,64	16,41 \pm 1,10	14,77 \pm 0,28	90,59 \pm 4,68	22,68 \pm 1,09	21,70 \pm 0,73	95,86 \pm 3,03	16,63 \pm 0,66	14,86 \pm 0,32	89,49*	313/312	3					
		9,58 \pm 0,91	10,69 \pm 0,36	112,25 \pm 6,90	14,46 \pm 1,69	15,93 \pm 1,78	110,27 \pm 0,54	21,15 \pm 1,15	21,50 \pm 2,10	101,39 \pm 4,44	15,27 \pm 1,27	16,49 \pm 1,52	107,91*	219/199	2					
23°C	100 μ M ^b	8,65 \pm 0,29	11,55 \pm 1,21	133,15 \pm 9,47	15,31 \pm 2,20	18,53 \pm 3,18	120,58 \pm 3,49	22,01 \pm 0,81	25,40 \pm 2,03	115,20 \pm 5,01	15,70 \pm 1,21	18,82 \pm 2,35	119,43**	239/235	2					
		8,65 \pm 0,29	8,63 \pm 0,31	100,00 \pm 6,94	15,31 \pm 2,20	15,95 \pm 2,05	104,45 \pm 1,59	22,01 \pm 0,81	24,01 \pm 2,06	108,89 \pm 5,35	15,70 \pm 1,21	16,20 \pm 1,25	103,15	239/220	2					
		5,96 \pm 0,26	9,01 \pm 0,23	151,55 \pm 10,38	9,35 \pm 0,15	15,78 \pm 0,84	168,62 \pm 6,22	15,11 \pm 0,04	19,07 \pm 1,24	126,23 \pm 8,54	10,50 \pm 0,01	15,45 \pm 0,91	147,21**	258/249	2					

Abkürzungen: Tg=Tag; SEM=Standardfehler des Mittelwertes; K=Kontrolle; TS=Tanninsäure; n=Anzahl

a= TS-Exposition nur bis zum 6. Adult-Tag; danach Kultivierung auf Kontrollplatten

b= Lebensdauer der F2-Generation

c= Lebensdauer der F2-Generation; TS-Exposition jedoch nur in Generation P und F1

* Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,05$ ** Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,005$

Tabelle 2: Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Gallussäure

Kondition	Minimale		Mediane		Variation		Maximale		Variation		Mittlere		n K/GS	n Ver- suche
	Lebensdauer [Tg]		Lebensdauer [Tg]		Lebensdauer [Tg]		Lebensdauer [Tg]		Lebensdauer [Tg]		Lebensdauer [Tg]			
	± SEM	K	± SEM	K	± SEM	K	± SEM	K	± SEM	K	± SEM	K		
15°C	300 µM	12,76 ± 1,61	13,60 ± 0,55	20,76 ± 1,18	21,50 ± 1,00	26,23 ± 0,40	107,76 ± 9,29	103,65 ± 1,10	27,68 ± 1,15	105,47 ± 2,75	20,57 ± 1,17	21,73 ± 0,91	210/231	2
		9,87 ± 0,38	10,31 ± 0,16	14,89 ± 0,75	15,56 ± 0,50	20,67 ± 0,83	104,79 ± 4,97	104,79 ± 3,08	21,98 ± 0,91	106,62 ± 5,75	15,54 ± 0,56	16,37 ± 0,48	334/329	3
		9,87 ± 0,38	10,48 ± 0,09	14,89 ± 0,75	16,34 ± 1,00	20,67 ± 0,83	106,44 ± 3,83	109,64 ± 1,35	21,97 ± 1,09	106,40 ± 4,49	15,54 ± 0,56	16,30 ± 0,53	334/372	3
		9,87 ± 0,38	10,98 ± 0,37	14,89 ± 0,75	16,97 ± 1,05	20,67 ± 0,83	111,29 ± 2,08	113,84 ± 1,39	22,87 ± 0,92	110,67 ± 0,76	15,54 ± 0,56	17,37 ± 0,80	334/380	3
20°C	400 µM	10,26 ± 0,07	11,18 ± 0,27	17,53 ± 0,53	18,18 ± 0,39	23,58 ± 0,58	109,00 ± 3,38	103,87 ± 5,37	23,92 ± 0,10	101,52 ± 2,10	17,47 ± 0,31	18,35 ± 0,02	318/309	2
		10,26 ± 0,07	9,67 ± 0,14	17,53 ± 0,53	17,11 ± 0,39	23,58 ± 0,58	94,29 ± 0,77	97,60 ± 0,70	24,25 ± 1,45	102,77 ± 3,60	17,47 ± 0,31	17,83 ± 0,51	318/278	2
		10,07 ± 0,12	10,22 ± 0,02	16,51 ± 1,55	16,59 ± 1,34	21,88 ± 2,28	101,46 ± 1,36	100,58 ± 1,36	22,68 ± 1,87	103,89 ± 2,28	16,63 ± 1,15	17,10 ± 1,31	227/216	2
		10,07 ± 0,12	11,65 ± 0,77	16,51 ± 1,55	17,88 ± 2,30	21,88 ± 2,28	115,57 ± 6,22	107,91 ± 3,77	24,01 ± 0,78	110,57 ± 7,95	16,63 ± 1,15	18,14 ± 1,67	227/245	2
23°C	300 µM	10,07 ± 0,12	9,91 ± 0,22	16,51 ± 1,55	16,70 ± 1,70	21,88 ± 2,28	98,45 ± 3,36	101,08 ± 0,81	22,10 ± 2,32	101,00 ± 0,08	16,63 ± 1,15	16,77 ± 1,16	227/233	2
		6,11 ± 0,06	6,49 ± 0,02	9,67 ± 0,38	12,38 ± 0,38	15,51 ± 0,41	106,24 ± 1,38	128,02 ± 1,15	19,03 ± 1,03	122,61 ± 3,40	10,81 ± 0,31	12,86 ± 0,33	230/217	2

Abkürzungen: Tg=Tag; SEM=Standardfehler des Mittelwertes; K=Kontrolle; GS=Gallussäure; n=Anzahl

a= GS-Exposition nur bis zum 6. Adult-Tag; danach Kultivierung auf Kontrollplatten

b= Lebensdauer der F2-Generation

c= Lebensdauer der F2-Generation; GS-Exposition jedoch nur in Generation P und F1

* Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,05$ ** Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,005$

Tabelle 3: Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Ellagsäure

Kondition	Minimale			Mediane			Maximale			Mittlere			n K/ES	n Ver- suche	
	Lebensdauer [Tg] ± SEM		Variation [%]	Lebensdauer [Tg] ± SEM		Variation [%]	Lebensdauer [Tg] ± SEM		Variation [%]	Lebensdauer [Tg] ± SEM		Variation [%]			
	K	ES	± SEM	K	ES	± SEM	K	ES	± SEM	K	ES	± SEM			
15°C	50 µM	12,76 ± 1,61	13,83 ± 0,28	109,82 ± 11,70	20,76 ± 1,19	20,99 ± 0,35	101,35 ± 4,13	26,23 ± 0,40	25,22 ± 0,04	96,17 ± 1,31	20,57 ± 1,17	20,77 ± 0,26	101,23 ± 4,50	210/246	2
		10,42 ± 0,08	10,79 ± 0,06	103,56 ± 0,13	16,07 ± 0,07	17,01 ± 0,30	105,85 ± 1,40	22,55 ± 0,25	23,50 ± 0,43	104,25 ± 3,07	16,80 ± 0,25	17,41 ± 0,15	103,67 ± 2,44	213/250	2
		10,40 ± 0,11	11,21 ± 0,12	107,76 ± 0,93	16,95 ± 0,57	18,84 ± 0,68	111,12 ± 0,32	23,23 ± 0,54	24,94 ± 0,38	107,43 ± 2,01	17,23 ± 0,36	18,78 ± 0,34	108,99** ± 0,37	359/434	3
20°C	100 µM	9,57 ± 0,38	9,91 ± 0,36	103,63 ± 0,41	14,26 ± 0,70	13,95 ± 1,22	97,64 ± 3,76	19,85 ± 0,25	20,19 ± 0,31	101,75 ± 2,84	15,04 ± 0,45	15,18 ± 0,69	100,92 ± 1,61	235/212	2
	200 µM	9,82 ± 0,34	10,44 ± 0,44	106,46 ± 4,71	15,17 ± 1,00	15,45 ± 1,15	101,82 ± 4,41	20,90 ± 1,06	21,01 ± 1,18	100,73 ± 5,09	15,74 ± 0,75	15,83 ± 0,81	100,55 ± 2,57	446/417	3
	300 µM	9,82 ± 0,34	10,03 ± 0,61	102,06 ± 3,26	15,17 ± 1,00	14,60 ± 0,86	96,43 ± 3,36	20,90 ± 1,06	20,99 ± 0,64	100,68 ± 2,56	15,74 ± 0,75	14,93 ± 0,48	95,19* ± 4,85	446/434	3
	50 µM ^a	10,34 ± 0,15	10,02 ± 0,30	96,89 ± 1,50	17,10 ± 0,96	17,55 ± 1,38	102,48 ± 2,29	23,23 ± 0,93	23,47 ± 0,93	101,02 ± 0,06	17,16 ± 0,62	17,58 ± 0,77	102,39 ± 0,82	206/225	2
	50 µM ^b	10,34 ± 0,15	11,10 ± 0,10	107,34 ± 2,47	17,10 ± 0,96	18,94 ± 1,34	110,67 ± 1,62	23,23 ± 0,93	25,04 ± 0,60	107,84 ± 1,76	17,16 ± 0,62	18,76 ± 0,81	109,27** ± 0,75	206/223	2
	50 µM ^c	10,34 ± 0,15	11,09 ± 0,54	107,35 ± 6,78	17,10 ± 0,96	16,87 ± 0,16	98,92 ± 4,62	23,23 ± 0,93	22,99 ± 0,01	99,13 ± 3,92	17,16 ± 0,62	17,46 ± 0,21	101,84 ± 2,45	206/212	2
23°C	50 µM	6,11 ± 0,06	6,70 ± 0,09	109,66 ± 0,39	9,67 ± 0,38	10,91 ± 0,59	112,71 ± 1,72	15,51 ± 0,41	15,73 ± 0,81	101,32 ± 2,58	10,81 ± 0,31	11,64 ± 0,51	107,58* ± 1,68	230/240	2

Abkürzungen: Tg=Tag; SEM=Standardfehler des Mittelwertes; K=Kontrolle; ES=Ellagsäure; n=Anzahl

a= ES-Exposition nur bis zum 6. Adult-Tag; danach Kultivierung auf Kontrollplatten

b= Lebensdauer der F2-Generation

c= Lebensdauer der F2-Generation; ES-Exposition jedoch nur in Generation P und F1

* Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,05$ ** Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,005$

Tabelle 4: Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Catechin

Kondition	Minimale			Mediane			Maximale			Mittlere			n K/CT	n Ver- suche	
	Lebensdauer [Tg] ± SEM		Variation [%]	Lebensdauer [Tg] ± SEM		Variation [%]	Lebensdauer [Tg] ± SEM		Variation [%]	Lebensdauer [Tg] ± SEM		Variation [%]			
	K	CT	± SEM	K	CT	± SEM	K	CT	± SEM	K	CT	± SEM			
15°C	200 µM	14,34 ± 0,63	16,79 ± 0,42	117,19 ± 2,21	20,90 ± 0,72	24,01 ± 0,27	115,00 ± 2,70	26,96 ± 0,14	30,22 ± 0,02	112,08 ± 0,64	21,01 ± 0,61	24,21 ± 0,11	115,32** ± 2,83	163/193	2
		10,54 ± 0,78	11,06 ± 0,83	105,47 ± 7,79	15,84 ± 0,97	17,62 ± 1,45	111,34 ± 7,44	23,20 ± 1,87	24,01 ± 2,17	103,41 ± 3,94	16,80 ± 1,04	18,21 ± 1,05	108,52* ± 1,44	349/383	3
20°C	200 µM	10,58 ± 0,55	11,77 ± 0,67	111,58 ± 5,84	16,13 ± 0,75	18,27 ± 1,33	113,14 ± 6,17	23,11 ± 1,33	23,83 ± 1,62	103,06 ± 3,80	16,91 ± 0,75	18,41 ± 1,16	108,57** ± 2,86	499/564	4
	300 µM	9,52 ± 1,16	10,59 ± 1,19	111,31 ± 1,01	15,06 ± 1,95	16,50 ± 2,07	109,62 ± 0,38	22,03 ± 0,83	22,55 ± 0,67	102,39 ± 0,82	15,88 ± 1,39	16,81 ± 1,41	105,92* ± 0,36	272/289	2
	400 µM	9,93 ± 0,39	10,21 ± 1,68	102,27 ± 12,86	15,50 ± 1,50	17,20 ± 1,03	111,34 ± 4,16	21,98 ± 1,01	23,50 ± 0,07	107,16 ± 5,24	16,14 ± 1,02	17,36 ± 1,03	107,59** ± 0,42	323/307	2
	800 µM	9,93 ± 0,39	10,46 ± 1,06	105,03 ± 6,50	15,50 ± 1,50	17,03 ± 1,16	110,18 ± 3,18	21,98 ± 1,01	22,84 ± 1,49	103,82 ± 2,01	16,14 ± 1,02	17,19 ± 1,15	106,48* ± 0,40	323/296	2
	200 µM ^a	9,12 ± 0,31	9,70 ± 0,41	106,33 ± 1,00	16,21 ± 1,93	16,50 ± 2,03	101,71 ± 0,38	23,59 ± 0,78	23,55 ± 2,06	99,67 ± 5,42	16,57 ± 0,88	17,02 ± 1,33	102,55 ± 2,55	226/248	2
	200 µM ^b	9,12 ± 0,31	10,12 ± 0,38	110,96 ± 0,40	16,21 ± 1,93	17,48 ± 1,75	108,08 ± 2,07	23,59 ± 0,78	25,88 ± 2,12	109,56 ± 5,34	16,57 ± 0,88	17,99 ± 1,07	108,51** ± 0,67	226/252	2
23°C	200 µM ^c	9,12 ± 0,31	9,67 ± 0,12	106,17 ± 2,24	16,21 ± 1,93	15,93 ± 1,45	98,57 ± 2,76	23,59 ± 0,78	24,45 ± 1,52	103,57 ± 3,00	16,57 ± 0,88	16,43 ± 0,75	99,20 ± 0,75	226/233	2
	200 µM	7,46 ± 0,05	8,32 ± 0,42	111,65 ± 6,46	11,23 ± 0,28	11,97 ± 0,04	106,65 ± 2,30	17,08 ± 0,43	18,81 ± 0,31	110,27 ± 4,56	12,03 ± 0,12	13,34 ± 0,12	110,90** ± 0,02	162/176	2

a= CT-Exposition nur bis zum 6. Adult-Tag; danach Kultivierung auf Kontrollplatten

b= Lebensdauer der F2-Generation

c= Lebensdauer der F2-Generation; CT-Exposition jedoch nur in Generation P und F1

* Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,05$ ** Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,005$

Tabelle 5: Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Tannine bei Fütterung toter Bakterien

Kondition	Minimale			Mediane			Maximale			Mittlere			n K/ Tannin	n Ver- suche
	Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Lebensdauer [Tg]		Variation [%]		
	± SEM			± SEM			± SEM			± SEM				
	K	Tannin	K	Tannin	K	Tannin	K	Tannin	K	Tannin	K	Tannin		
TS 100 µM	12,12 ± 0,63	18,24 ± 3,07	149,61 ± 17,58	26,29 ± 0,29	30,88 ± 0,55	117,45 ± 0,80	38,19 ± 1,21	38,53 ± 1,17	100,88 ± 0,12	25,30 ± 0,59	30,13 ± 1,17	119,08** ± 1,83	201/211	2
TS 100 µM ^a	12,12 ± 0,63	14,60 ± 2,10	119,94 ± 11,15	26,29 ± 0,29	27,25 ± 1,43	103,61 ± 4,30	38,19 ± 1,21	37,37 ± 0,99	97,86 ± 0,52	25,30 ± 0,59	26,98 ± 1,25	106,59 ± 2,45	201/194	2
GS 300 µM	11,73 ± 0,22	11,98 ± 1,66	101,90 ± 12,24	29,62 ± 0,25	28,25 ± 2,76	95,29 ± 8,50	39,08 ± 0,17	39,98 ± 0,13	102,31 ± 0,77	26,99 ± 0,12	26,93 ± 1,23	99,75 ± 4,09	204/204	2
GS 300 µM ^a	11,73 ± 0,22	12,47 ± 1,19	106,49 ± 12,10	29,62 ± 0,25	28,95 ± 1,28	97,76 ± 5,13	39,08 ± 0,17	38,85 ± 0,15	99,42 ± 0,07	26,99 ± 0,12	27,21 ± 0,93	100,82 ± 3,88	204/216	2
ES 50 µM	11,73 ± 0,22	13,10 ± 1,64	111,46 ± 11,89	29,62 ± 0,25	29,44 ± 1,69	99,35 ± 4,87	39,08 ± 0,17	37,54 ± 0,07	96,06 ± 0,26	26,99 ± 0,12	26,61 ± 0,51	98,59 ± 1,45	204/227	2
ES 50 µM ^a	11,73 ± 0,22	12,93 ± 1,02	110,07 ± 6,67	29,62 ± 0,25	26,82 ± 1,02	90,51 ± 2,67	39,08 ± 0,17	38,55 ± 0,75	98,67 ± 2,36	26,99 ± 0,12	26,66 ± 0,85	98,75 ± 2,73	204/227	2
CT 200 µM	11,07 ± 0,20	13,58 ± 0,72	122,67 ± 5,63	28,06 ± 0,80	31,56 ± 1,32	112,75 ± 6,72	37,78 ± 0,88	38,27 ± 1,02	101,50 ± 4,64	25,38 ± 0,28	27,97 ± 0,83	110,18** ± 2,19	330/289	3
CT 200 µM ^a	11,24 ± 0,19	14,04 ± 0,26	124,87 ± 0,24	27,81 ± 1,31	29,14 ± 0,01	105,02 ± 4,99	38,04 ± 1,46	36,46 ± 1,52	95,84 ± 0,31	25,62 ± 0,24	26,37 ± 0,20	102,93 ± 1,76	196/219	2

Abkürzungen: Tg=Tag; SEM=Standardfehler des Mittelwertes; K=Kontrolle; n=Anzahl; TS=Tanninsäure; GS=Gallussäure; ES=Ellagsäure; CT=Catechin

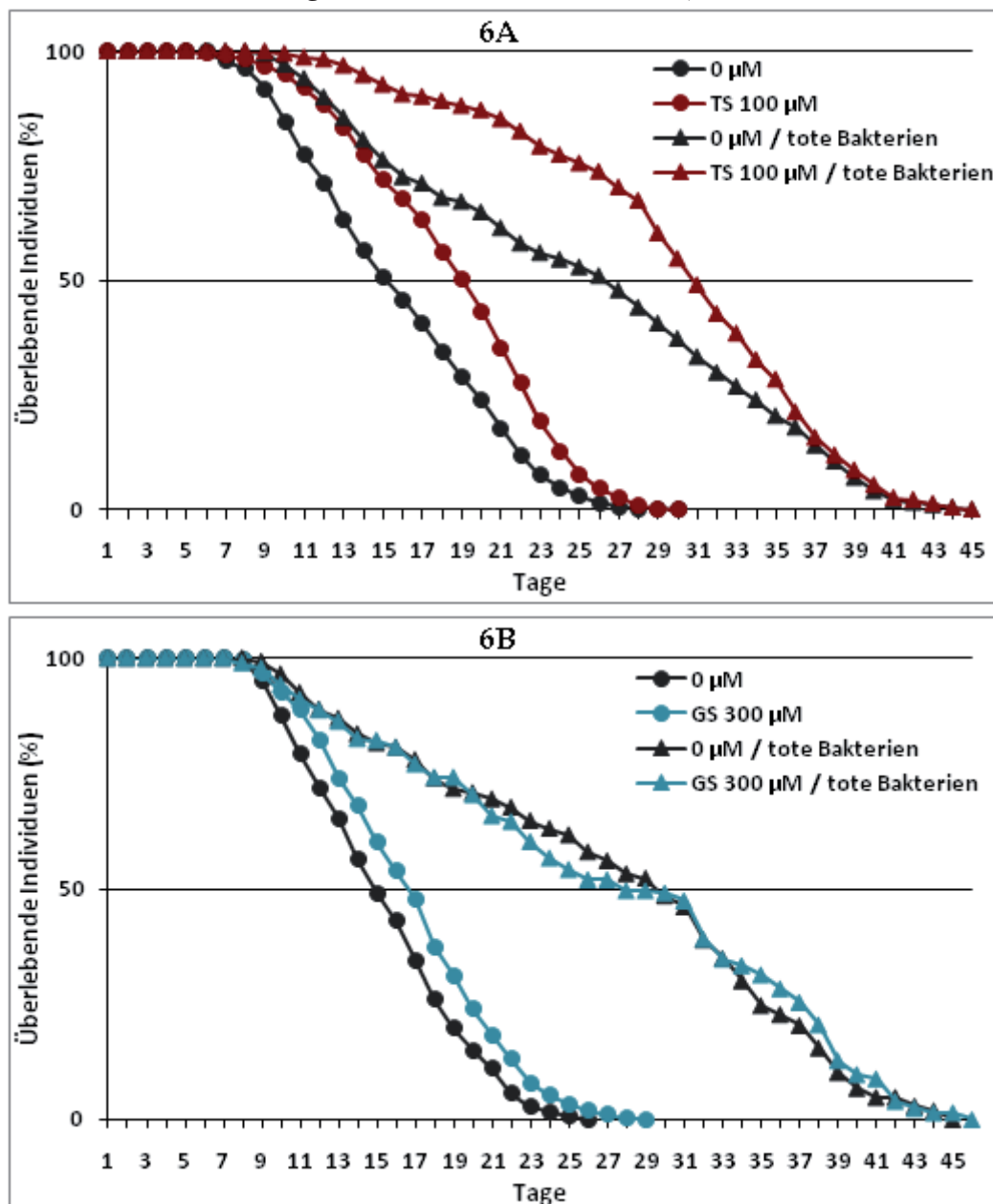
^a= Tannin-Exposition nur bis zum 6. Adult-Tag; danach Kultivierung auf Kontrollplatten

* Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,05$

** Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,005$

Ein Transgenerationseffekt konnte bei keinem der Tannine ermittelt werden (Tab. 1-4). Die Lebensverlängerung in der F2-Generation war in allen Fällen vergleichbar mit der F1-Generation, so dass alle Tannine auch in der Folgegeneration bei anhaltender Exposition wirksam blieben. Wird die Exposition nur in Generation P und F1 aufrecht erhalten, jedoch nicht in Generation F2, so geht auch der lebensverlängernde Effekt verloren. Es findet also offensichtlich keinerlei „Vererbung“ der Lebensverlängerung statt.

Darüber hinaus wurde die Relevanz der antimikrobiellen Kapazitäten der Tannine getestet, indem hitzegetötete Bakterien zur Fütterung verwendet wurden. Um die Anzahl zensierter (vom Test ausgeschlossener) Tiere zu reduzieren (aufgrund von „internal hatch“ und Platten-Flucht insbesondere in der Reproduktionsphase), wurden zunächst lebende Bakterien bis zum 6. Adult-Tag gefüttert. Dieses Ernährungs-Protokoll führte zu einer starken Zunahme der Lebensdauer verglichen mit Würmern, die lebenslang vitale Bakterien bekamen (Abb. 6; Tab. 5; Tab. A6).



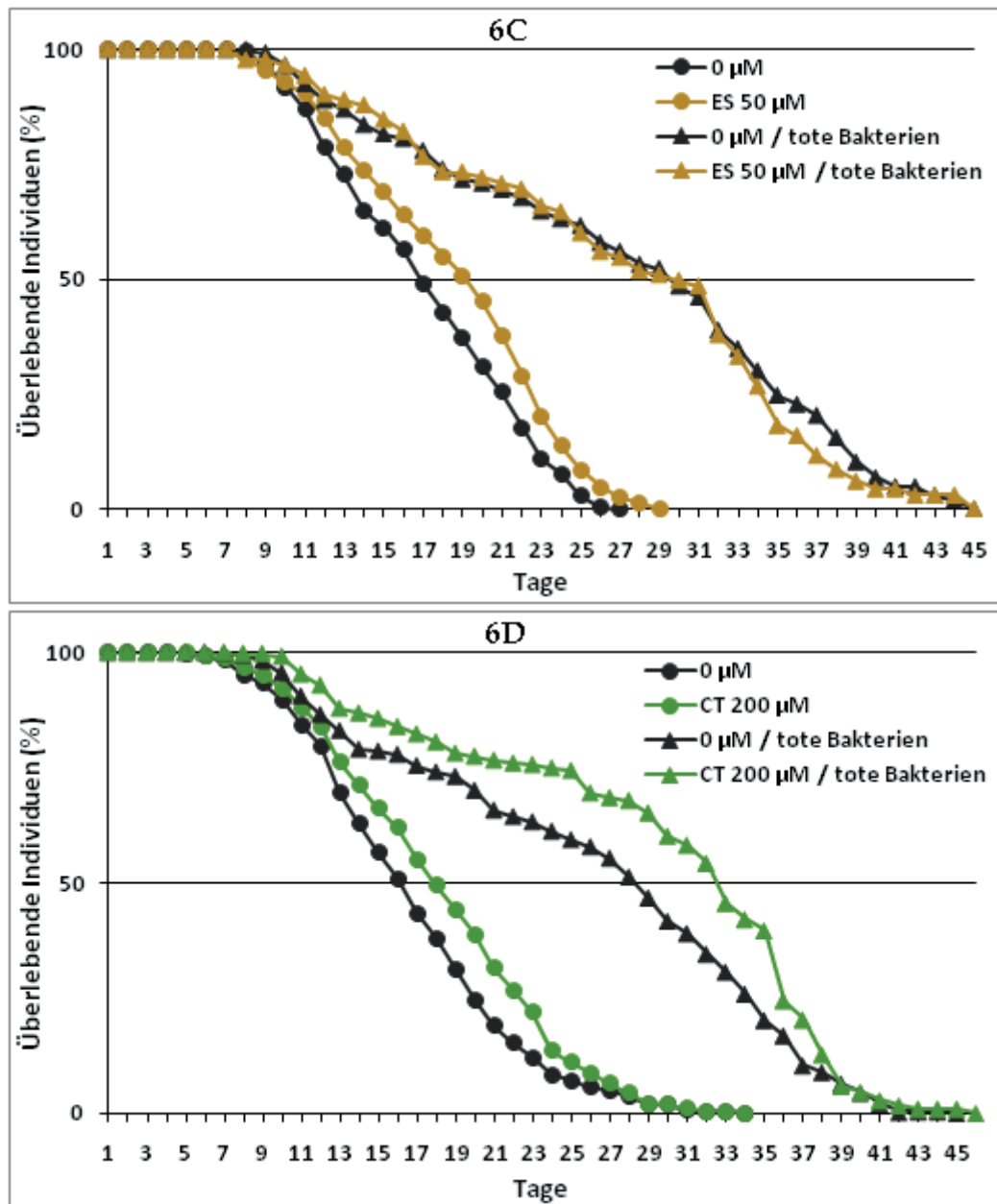


Abb. 6: Überlebenskurven bei Tannin-Exposition mit zwei Futterqualitäten

Die Überlebenskurven der effektivsten Tannin-Konzentrationen 100 μM TS (A), 300 μM GS (B), 50 μM ES (C) und 200 μM CT (D) wurden dargestellt. Die Kurven repräsentieren die Mittelwerte der Einzelversuche bei 20°C. Die zwei jeweils linken Kurven illustrieren das Überleben unter Verwendung lebender Bakterien in An- und Abwesenheit des jeweiligen Tannins. Die zwei jeweils rechten Kurven mit einem wesentlich seichterem Verlauf stellen die Überlebenskurven unter Einsatz von hitzegetöteten Bakterien dar, ebenfalls in An- und Abwesenheit der Testsubstanz. Der erste Tag bezieht sich auf den 1. Adult-Tag.

Die mittlere Lebensdauer konnte auch unter Verwendung hitzegetöteter Bakterien signifikant durch 100 μM Tanninsäure erhöht werden (**Abb. 6A, Tab. 5**). Ebenfalls reichte die TS-Exposition bis zum 6. Adult-Tag aus, um eine leichte, wenn auch nicht signifikante, Lebensverlängerung zu erreichen. Die prozentualen Variationen der mittleren Lebensdauer waren vergleichbar in den beiden Fütterungsszenarien: Die anfängliche bzw. lebenslange TS-Exposition erlangte eine Lebensverlängerung von rund 8% bzw. 18% bei Verwendung vitaler Bakterien (**Tab. 1**), und rund 7% bzw. 19% bei Einsatz von getöteten Bakterien (**Tab. 5**). Die minimale Lebensdauer wurde erneut am stärksten beeinflusst, wobei es kaum Unterschiede in der maximalen Lebensdauer gibt.

Ein ähnliches Bild, jedoch mit schwächerer Ausprägung, ergab sich durch Behandlung mit 200 μM Catechin (**Tab. 5, Abb. 6D**). Bei Verwendung von vitalen Bakterien konnte die mittlere Lebensdauer um rund 9% und von toten Bakterien um rund 10% erhöht werden. Auch hier ist erkennbar, dass die mediane und insbesondere minimale Lebensdauer von der CT-Exposition profitieren, die maximale jedoch nur marginal beeinflusst wird. In beiden Fütterungsszenarien reichte eine Exposition bis zum 6. Adult-Tag nicht aus, um eine markante Lebensverlängerung zu erzielen.

Gallussäure und Ellagsäure konnten im Gegensatz dazu keine Verlängerung der mittleren Lebensdauer in diesem Testszenario erwirken (**Tab. 5, Abb. 6B & 6C**). Weder der Einsatz der Tannine bis zum 6. Adult-Tag noch die lebenslange Exposition waren ausreichend, um signifikante Unterschiede in der Lebensdauer bei Fütterung toter Bakterien zu erreichen.

3.2 Selektive Wirkung von Tanninen auf Stress

Da eine Korrelation von erhöhter Resistenz gegenüber Hitze bzw. oxidativem Stress und einer ausgedehnten Lebensdauer in *C. elegans* beobachtet wurde (Lithgow et al., 1995; Johnson et al., 2002; Muñoz & Riddle, 2003; Wilson et al., 2006), wurde diese Wechselbeziehung auch in dieser Untersuchung erwartet. Tatsächlich konnte 100 μM TS nicht nur das Leben verlängern, sondern auch die Resistenz gegenüber thermischem und oxidativem Stress verbessern (**Abb. 7**). Die Einzelversuche und Mittelwerte zur Hitze-Stressresistenz sind überwiegend einheitlich mit einem klaren Vorteil für Tiere, die mit 100 μM , 200 μM und 300 μM TS behandelt wurden (**Abb. 7A**). 50 μM aber insbesondere 25 μM und 400 μM konnten keine signifikante Gesamtänderung erzielen. Die Einzelversuche zur Ermittlung der oxidativen Stresstoleranz ergaben jedoch sehr variable und weniger schlüssige Ergebnisse (**Abb. 7B**). Nur im ersten Versuch konnten eindeutig Vorteile durch Verwendung von 100 μM , 200 μM und 300 μM TS erlangt werden, wobei in den anderen beiden Versuchen keine oder negative Veränderungen aller Konzentrationen beobachtet wurden.

Insgesamt führte nur 100 μM TS zu einer signifikanten Verbesserung der oxidativen Stressresistenz, indes führte 400 μM TS zu einer Verschlechterung der Resistenz.

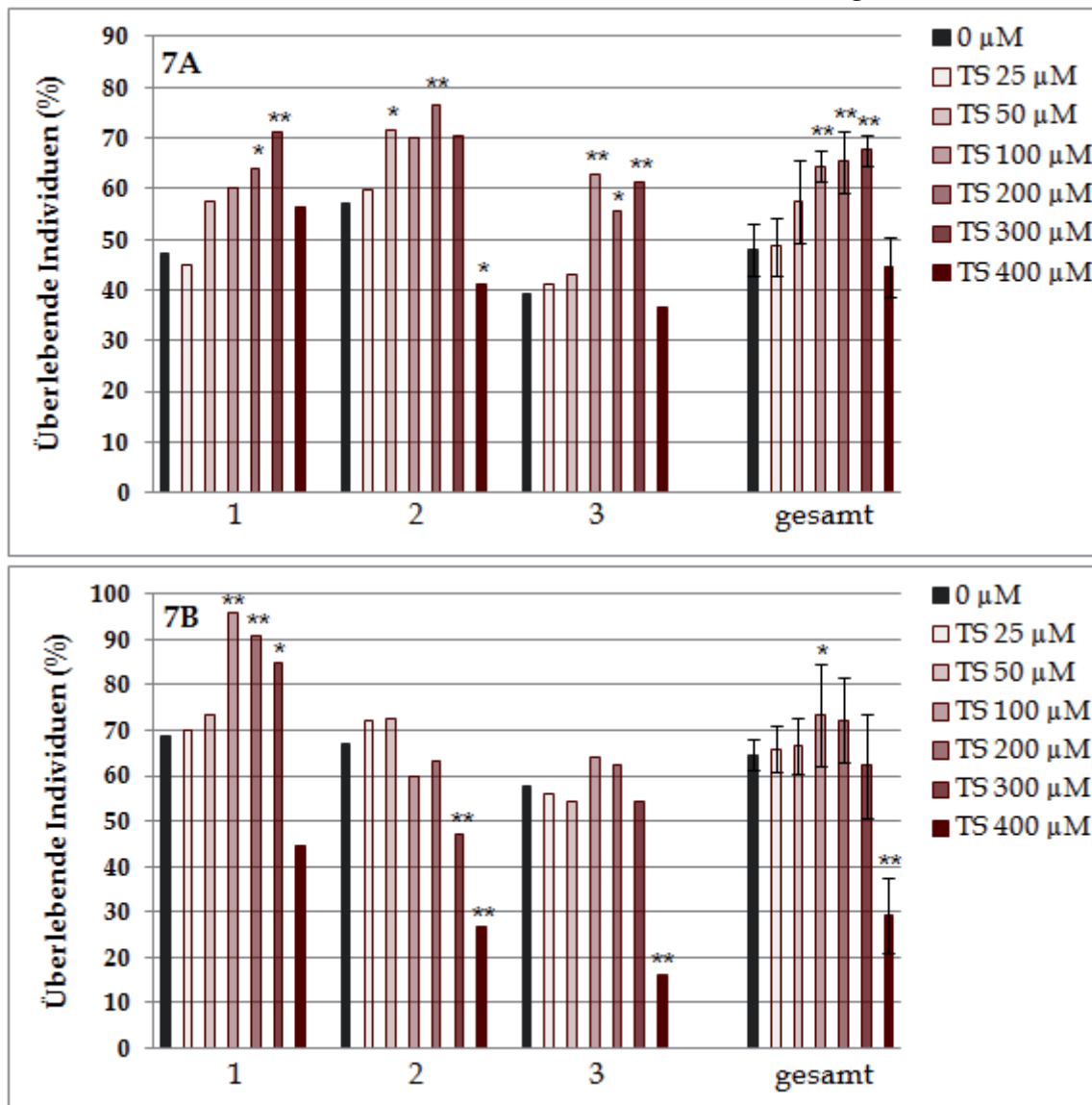


Abb. 7: Einfluss von Tanninsäure auf die oxidative und thermische Stressresistenz

Wildtyp-Nematoden wurden mit sechs verschiedenen TS-Konzentrationen behandelt und mit unbehandelten Tieren bezüglich der Stressresistenz verglichen. Am 6. Adult-Tag wurden die Tiere 8 Stunden 35°C (A) bzw. 0,8 mM H_2O_2 (B) ausgesetzt. Anschließend wurden tote und lebende Tiere ausgezählt. Dargestellt sind jeweils die Überlebensraten der drei Einzelversuche (1-3) und die Mittelwerte (gesamt). Die Gesamtanzahl beobachteter Tiere betrug für den thermischen Stresstest (A) $n=335$ (0 μM), $n=324$ (25 μM), $n=333$ (50 μM), $n=333$ (100 μM), $n=328$ (200 μM), $n=317$ (300 μM) und $n=358$ (400 μM). Der oxidative Stresstest (B) umfasste $n=335$ (0 μM), $n=358$ (25 μM), $n=352$ (50 μM), $n=360$ (100 μM), $n=362$ (200 μM), $n=367$ (300 μM) und $n=351$ (400 μM). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes und Unterschiede zur Kontrolle (0 μM) gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

Die Tests unter Verwendung von Gallussäure zeigten ähnliche Tendenzen (**Abb. 8**). Die Thermotoleranz konnte durch 400 μM und 800 μM GS deutlich verbessert werden, wobei die anderen lebensverlängernd-wirkenden Konzentrationen 100 μM , 200 μM und 300 μM GS in der Gesamtheit nicht überzeugen konnten (**Abb. 8A**). Einzig 300 μM konnte in einem Einzelversuch einen Vorteil erzielen. Im Gegensatz dazu konnte keine der GS-Konzentrationen die oxidative Stressresistenz verbessern (**Abb. 8B**).

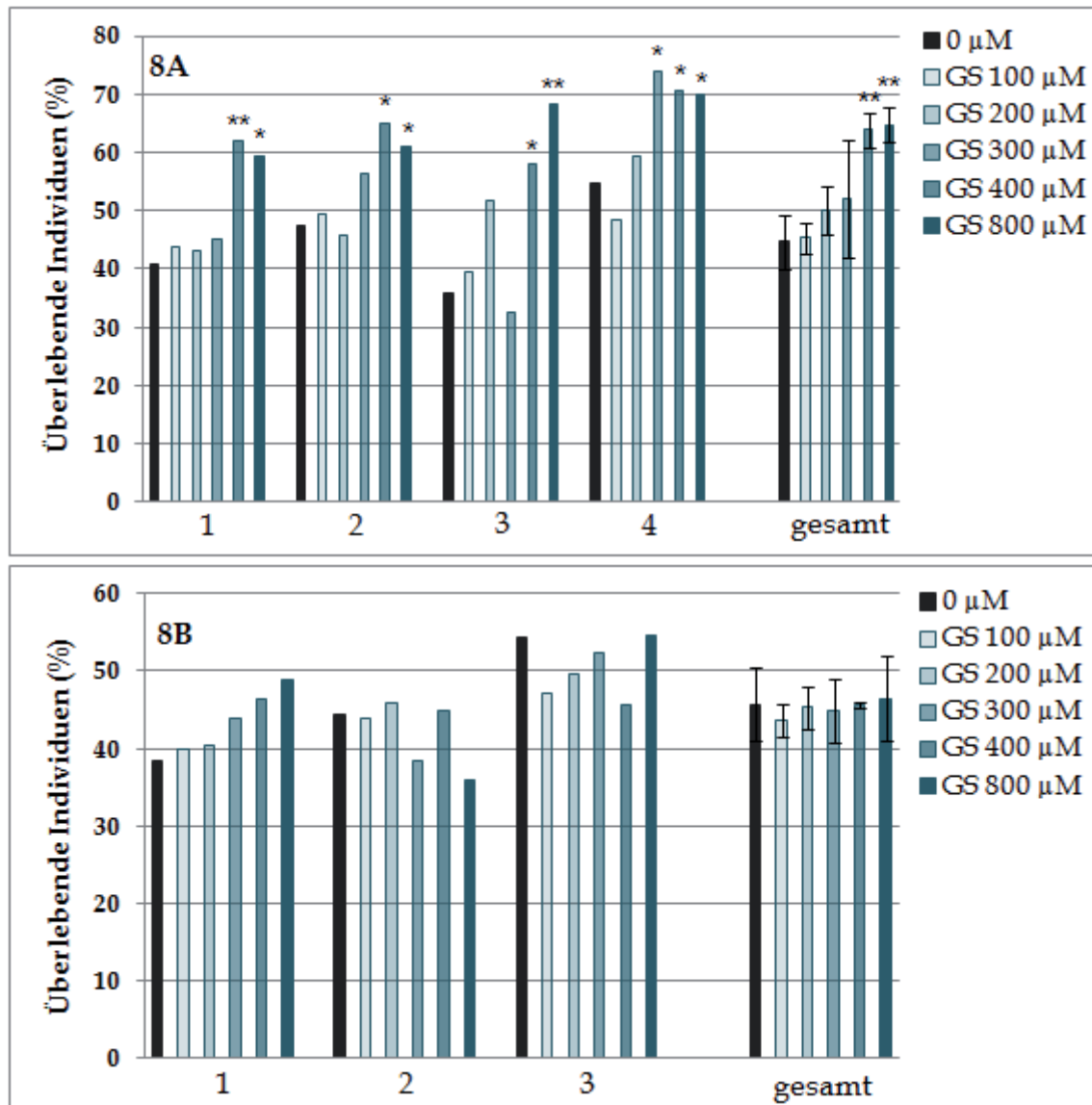


Abb. 8: Einfluss von Gallussäure auf die oxidative und thermische Stressresistenz

Gallussäure wurde in fünf Konzentrationen bezüglich der Stressresistenz getestet. Die Abbildung illustriert die Überlebenden nach 8-stündiger Behandlung mit 35°C (**A**) bzw. 0,8 mM H_2O_2 (**B**). Dargestellt sind jeweils die Überlebensraten der Einzelversuche (1-3 bzw. 4) und die Mittelwerte (gesamt). Die Gesamtanzahl beobachteter Tiere betrug für den thermischen Stresstest (**A**) $n=427$ (0 μM), $n=428$ (100 μM), $n=392$ (200 μM), $n=392$ (300 μM), $n=381$ (400 μM) und $n=433$ (800 μM). Der oxidative Stresstest (**B**) umfasste $n=368$ (0 μM), $n=380$ (100 μM), $n=385$ (200 μM), $n=333$ (300 μM), $n=338$ (400 μM) und $n=347$ (800 μM). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes und Unterschiede zur Kontrolle (0 μM) gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

Interessanterweise wies Ellagsäure keinerlei Stressresistenz-Potential auf (Abb. 9). Nur 200 μM ES konnte in einem Einzelversuch eine erhöhte Resistenz gegen thermischen Stress erwirken. Im Gesamtergebnis erzielte jedoch nur 300 μM ES eine signifikante Veränderung, allerdings durch eine Verschlechterung der Resistenz (Abb. 9A). Beim oxidativen Stresstest wirkten sogar alle Konzentrationen, mit Ausnahme von 25 μM ES, toxisch (Abb. 9B).

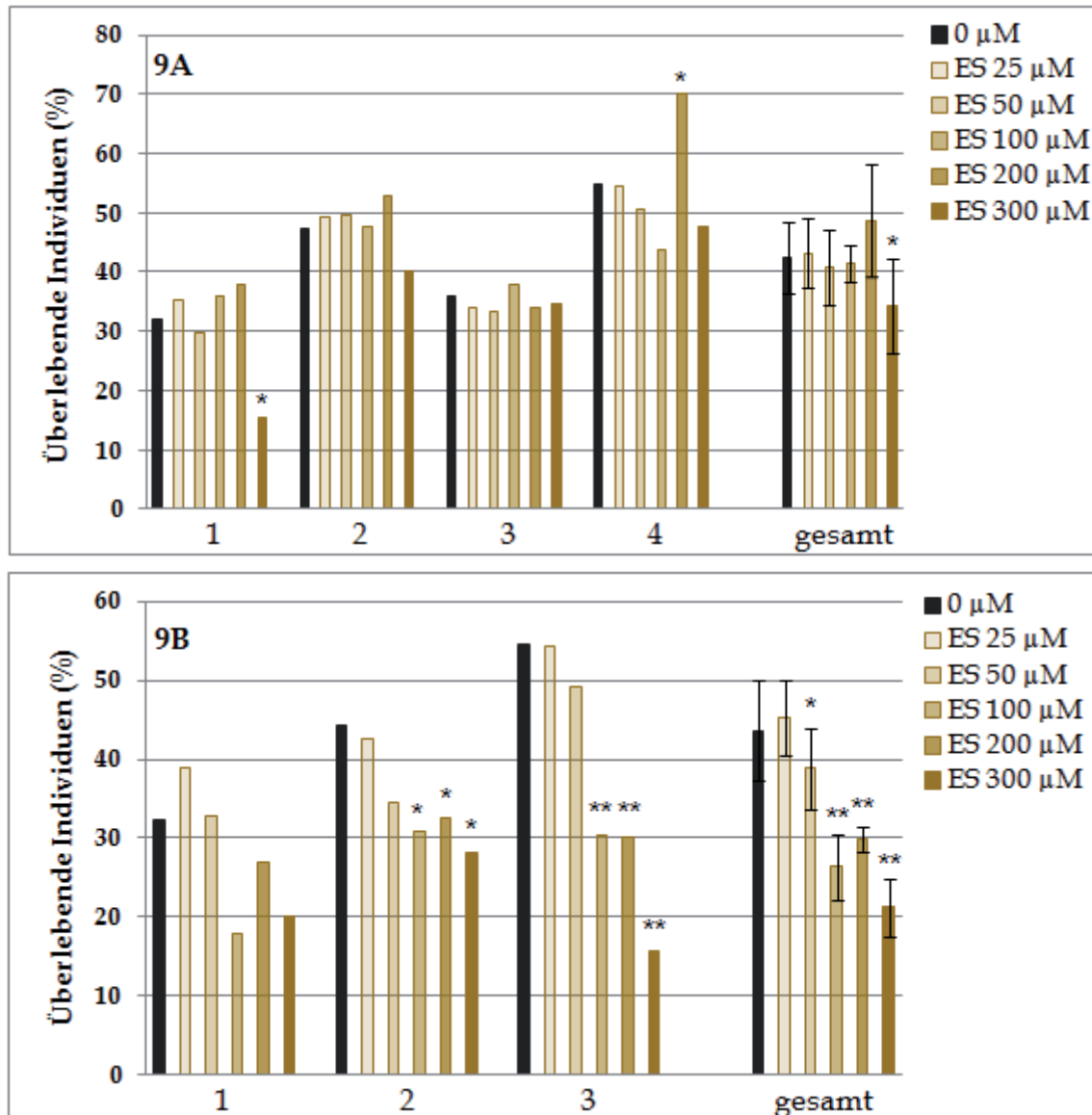


Abb. 9: Einfluss von Ellagsäure auf die oxidative und thermische Stressresistenz

Ellagsäure wurde in fünf Konzentrationen bezüglich der Stressresistenz getestet. Die Abbildung illustriert die Überlebenden nach 8-stündiger Behandlung mit 35°C (A) bzw. 0,8 mM H_2O_2 (B). Dargestellt sind jeweils die Überlebensraten der Einzelversuche (1-3 bzw. 4) und die Mittelwerte (gesamt). Die Gesamtanzahl beobachteter Tiere betrug für den thermischen Stresstest (A) $n=397$ (0 μM), $n=390$ (25 μM), $n=352$ (50 μM), $n=388$ (100 μM), $n=375$ (200 μM) und $n=361$ (300 μM). Der oxidative Stresstest (B) umfasste $n=378$ (0 μM), $n=390$ (25 μM), $n=333$ (50 μM), $n=322$ (100 μM), $n=346$ (200 μM) und $n=352$ (300 μM). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes und Unterschiede zur Kontrolle (0 μM) gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

Eine Catechin-Exposition zeigte bezüglich der Stressresistenz erneut ein anderes Bild (Abb. 10). Nur 200 μM CT führte im Gesamtergebnis zu einer leichten aber signifikanten Toleranz gegenüber Hitzestress (Abb. 10A). In keinem der Einzelversuche reichte die Behandlung mit 200 μM CT jedoch für ein signifikantes Ergebnis aus. Im Gegensatz dazu konnten alle CT-Konzentrationen, mit Ausnahme der 100 μM , zu einer signifikanten Verbesserung der oxidativen Stressresistenz führen (Abb. 10B). 300 μM und 400 μM CT konnten sogar in jedem Einzelversuch signifikante Ergebnisse erlangen.

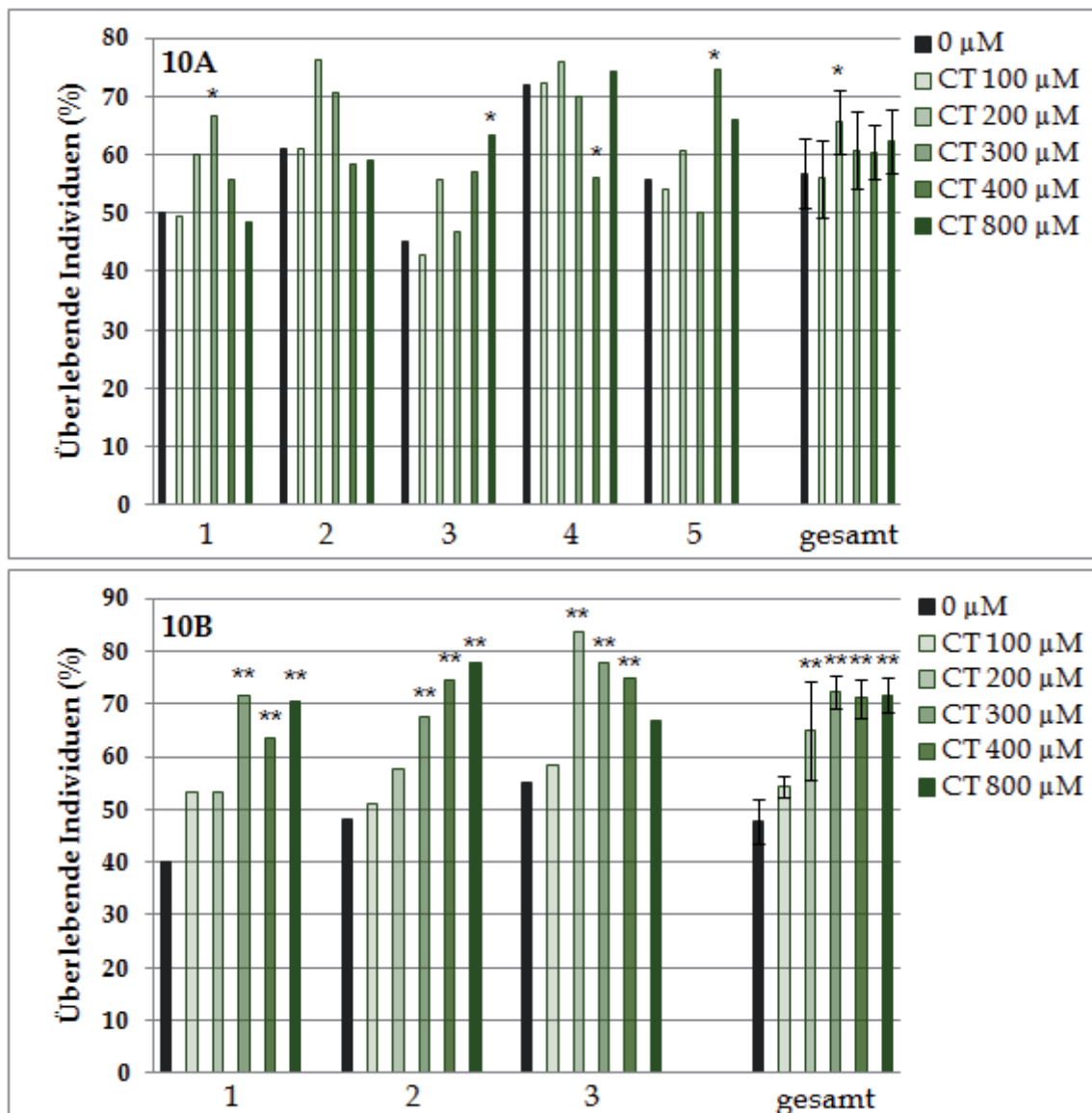


Abb. 10: Einfluss von Catechin auf die oxidative und thermische Stressresistenz

Catechin wurde in fünf Konzentrationen bezüglich der Stressresistenz getestet. Die Abbildung illustriert die Überlebenden nach 8-stündiger Behandlung mit 35°C (A) bzw. 0,8 mM H_2O_2 (B). Dargestellt sind jeweils die Überlebensraten der Einzelversuche (1-3 bzw. 5) und die Mittelwerte (gesamt). Die Gesamtanzahl beobachteter Tiere betrug für den thermischen Stresstest (A) $n=439$ (0 μM), $n=390$ (100 μM), $n=426$ (200 μM), $n=453$ (300 μM), $n=428$ (400 μM) und $n=464$ (800 μM). Der oxidative Stresstest (B) umfasste $n=341$ (0 μM), $n=336$ (100 μM), $n=292$ (200 μM), $n=336$ (300 μM), $n=352$ (400 μM) und $n=345$ (800 μM). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes und Unterschiede zur Kontrolle (0 μM) gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

3.3 Schwache Auswirkungen der Tannine auf die Reproduktion

Um potentielle Veränderungen der reproduktiven Kapazitäten zu ermitteln, wurden die Nachkommen von behandelten und unbehandelten Tieren ausgezählt, wobei jeweils die effektivste Tannin-Konzentration (gemessen an der mittleren Lebensdauer) ausgewählt wurde. **Abbildung 11** fasst die Ergebnisse zusammen. Tanninsäure-behandelte Tiere zeigten zwar eine leicht verminderte Reproduktion, jedoch erwies sich dieser Effekt als nicht signifikant (**Abb. 11A**).

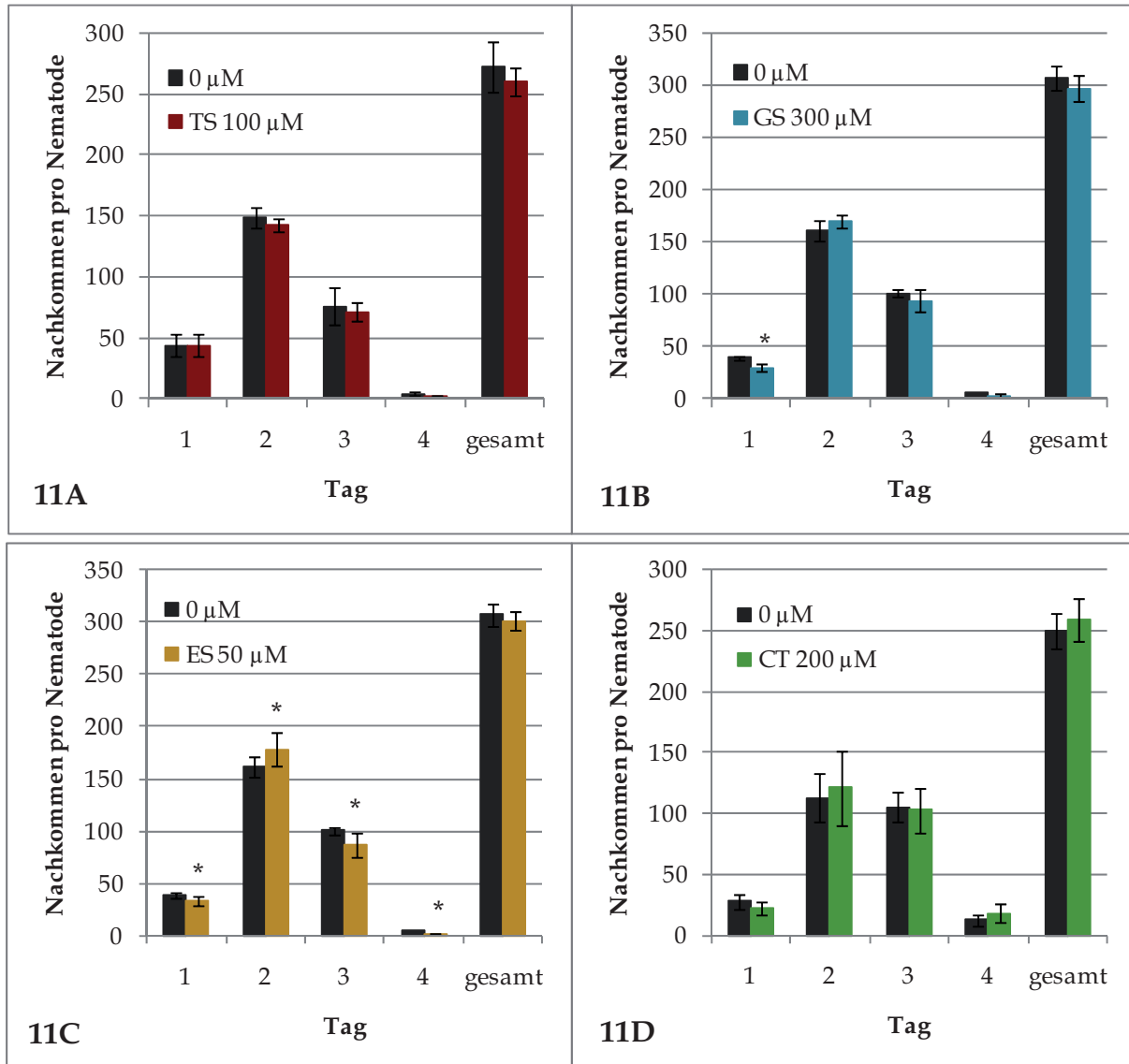


Abb. 11: Auswirkung der Tannine auf die Reproduktions-Kapazität

Die Nachkommen von 100 µM TS (A), 300 µM GS (B), 50 µM ES (C) und 200 µM CT (D)-behandelten Tieren sowie unbehandelten Kontrolltieren wurden ausgezählt. Die tägliche Reproduktionsleistung als auch die Gesamtanzahl der Nachkommen wurden von insgesamt 40 (TS) bzw. 30 Tieren (GS, ES & CT) in vier bzw. drei Einzelversuchen pro Konzentration erfasst. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aller Einzelversuche und der erste Tag entspricht dem 1. Adult-Tag. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes und Unterschiede zur Kontrolle (0 µM) gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

Im Gegensatz dazu führte die Verwendung von 300 μM GS zu einer signifikanten Abnahme der Reproduktion am ersten Reproduktions-Tag (**Abb. 11B**). 50 μM ES war sogar in der Lage, die Reproduktion an allen Tagen zu verändern (**Abb. 11C**). Mit Ausnahme der signifikanten Erhöhung der Reproduktionsleistung am zweiten Tag, führte ES zu einer Verminderung der Reproduktion an den übrigen Tagen. Die Gesamt-Nachkommenzahl wurde jedoch weder durch Gallussäure noch durch Ellagsäure beeinflusst. Catechin konnte weder die Gesamt-Reproduktionskapazität noch das Reproduktionsmuster an den einzelnen Tagen beeinflussen (**Abb. 11D**).

Zur genaueren Analyse der Reproduktions-Variation wurden zwei zusätzliche Reproduktionstests hinzugezogen, die auf einer Synchronisation im Ei-Stadium beruhen und somit die Larvalentwicklung einbeziehen. Zum Einen wurde der Zeitpunkt der ersten Eiablage ermittelt (**Abb. 12**), zum Anderen die Nachkommenzahl nach 85 Stunden ab Ei-Stadium (**Abb. 13**). Die erste Eiablage wurde durch 300 μM GS und 50 μM ES signifikant verzögert (**Abb. 12**). Auch für 100 μM TS behandelte Tiere ist ein Trend zur Verzögerung ersichtlich, jedoch ergab sich hier keine Signifikanz. Nur Catechin zeigte keinerlei Merkmale einer verspäteten Eiablage.

Die sich bereits angedeutete Reproduktions-Variation wurde nach 85 Stunden ab Ei-Stadium noch deutlicher. Tanninsäure, Gallussäure und Ellagsäure verminderten die initiale Reproduktionsleistung signifikant (**Abb. 13**). Nur die Catechin-Exposition führte zu keiner Veränderung.

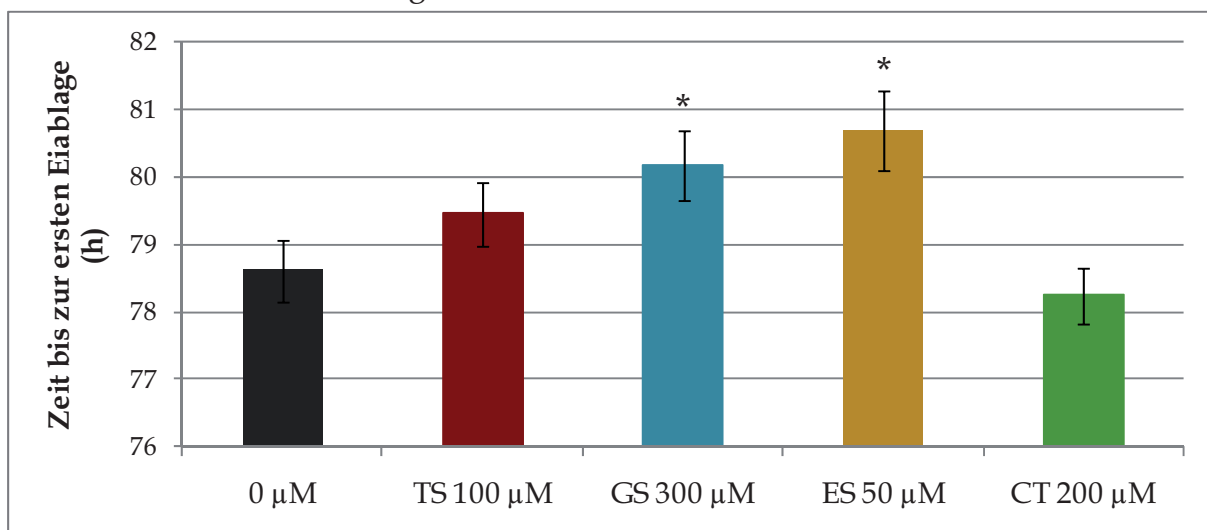


Abb. 12: Zeitpunkt der ersten Eiablage

Je 60 Tiere in zwei unabhängigen Experimenten wurden stündlich beobachtet. Der Zeitpunkt (in Stunden) der ersten Eiablage wurde als Mittelwert dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes und Unterschiede zur Kontrolle (0 μM) gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

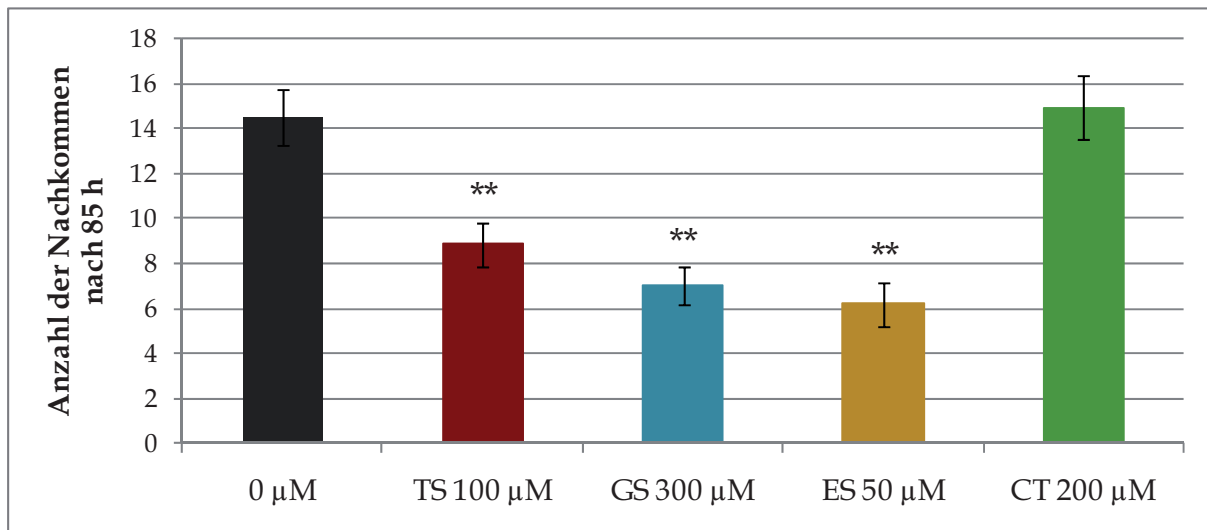


Abb. 13: Initiale Reproduktions-Leistung

Die Nachkommen von je 60 Tieren in zwei unabhängigen Experimenten wurden nach 85 Stunden ab Ei-Stadium ausgezählt. Die Nachkommen aller Tiere wurden als Mittelwert dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes und Unterschiede zur Kontrolle (0 µM) gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

3.4 Tannine verursachen deutliche Veränderungen im Längenwachstum

Die Möglichkeit der Beeinträchtigung des Wachstums bei zeitgleicher Verlängerung des Lebens wurde durch Längenmessung am 6. Adult-Tag beurteilt (**Abb. 14**). Die Tiere wurden erneut jeweils mit der effektivsten Tannin-Konzentration (gemessen an der mittleren Lebensdauer) behandelt. 100 µM Tanninsäure (**Abb. 14A**) als auch 200 µM Catechin (**Abb. 14D**) verursachten in fast allen Einzelversuchen als auch im Gesamtergebnis eine signifikante Reduktion der Körperlänge. Im Gegensatz dazu bewirkte 300 µM Gallussäure eine markante Zunahme der Körperlänge (**Abb. 14B**). 50 µM Ellagsäure führte wiederum insgesamt zu einer leichten Reduktion der Größe, die sich jedoch nur in einem Einzelversuch als signifikant erwies (**Abb. 14C**).

Um zusätzlich zu überprüfen, wie die Körperlänge während der Larval- und Jungadult-Entwicklung variiert, wurden die Tiere in einem weiteren Test im Ei-Stadium synchronisiert und täglich vermessen (**Abb. 15**). 100 µM TS verursachte am ersten Tag, an dem sich die Tiere im L1-Stadium befanden, keinerlei Wachstumsbeeinträchtigungen (**Abb. 15A**). Doch bereits am zweiten und dritten Tag ist eine Tendenz, wenn auch nicht signifikant, zur Längenreduktion erkennbar. Am vierten Tag hatten alle Nematoden das Adult-Stadium erreicht und die Wachstumsreduktion erwies sich fortan als signifikant. Unter Gallussäure-Einfluss ist bereits ab dem dritten Tag eine signifikante Auswirkung zu verzeichnen (**Abb. 15B**). 300 µM GS führte jedoch im Gegensatz zur Tanninsäure zu einer deutlichen Steigerung der Körperlänge. Ellagsäure konnte auch in diesem Szenario keine ausgeprägte Variation verursachen (**Abb. 15C**), ein leichter Trend zur Längenreduktion ist aber erneut erkennbar. 200 µM CT sorgte für eine Reduktion der Länge ab dem fünften Tag, im Larval-Stadium waren aber kaum Veränderungen zu erkennen (**Abb. 15 D**).

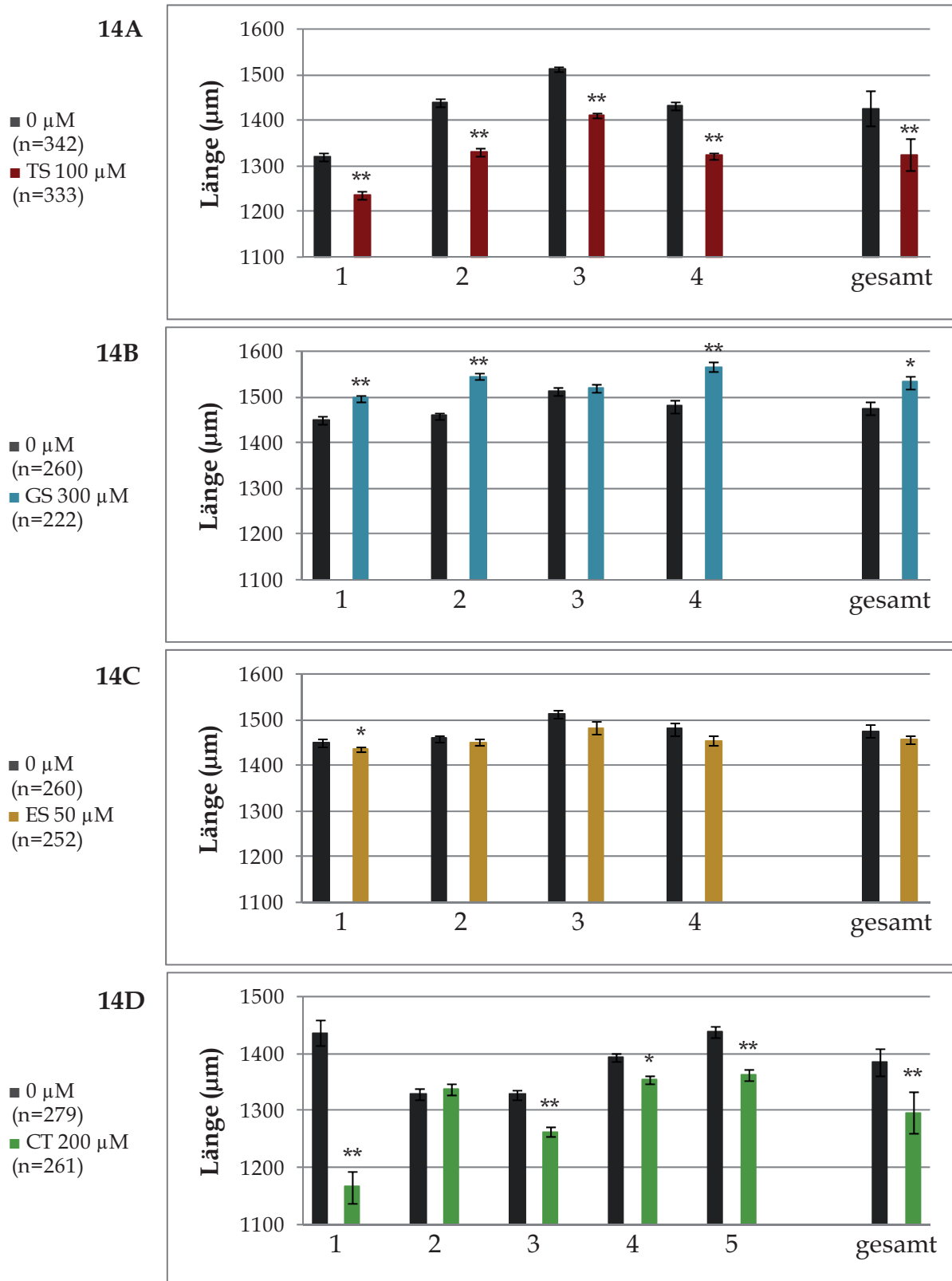


Abb. 14: Veränderung der Körperlänge nach Tannin-Exposition

Die Länge der behandelten und unbehandelten Tiere wurde am 6. Adult-Tag gemessen. Dargestellt sind jeweils die Einzelversuche (1-4 bzw. 5) als auch die Mittelwerte (gesamt). Die Anzahl der beobachteten Tiere ist in der Legende angegeben. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes und Unterschiede zur Kontrolle gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

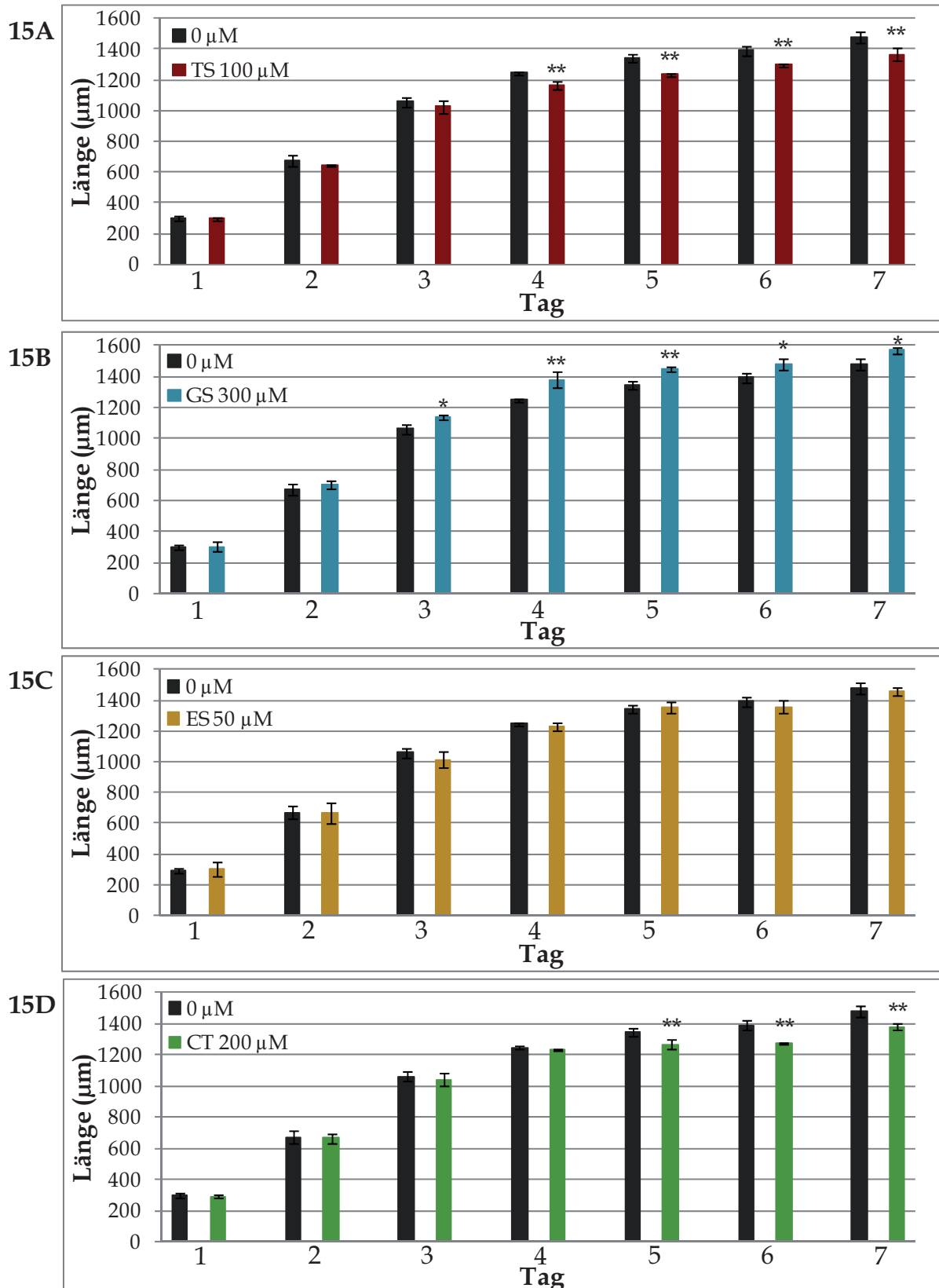


Abb. 15: Entwicklung der Körperlänge unter Tannin-Einfluss

Die Länge der behandelten und unbehandelten Tiere wurde während der Larval- und Jungadult-Entwicklung gemessen. Tag 1 entspricht einem Tag nach dem Ei-Stadium und jeder Balken repräsentiert das Mittel von zwei unabhängigen Experimenten. Zwischen 120 und 133 Tiere pro Tag und Konzentration wurden insgesamt protokolliert. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes und Unterschiede zur Kontrolle gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

3.5 Einfluss auf weitere Lebensparameter

Um die Wirkungsweise der Tannine besser einordnen und interpretieren zu können, wurden weitere Lebensparameter untersucht. Dazu zählen die körperliche Fitness, der Fettstoffwechsel, die antioxidative Kapazität und die Attraktion der Substanzen. Die körperliche Fitness soll hier zunächst anhand der Mobilität bestimmt werden. Unterschieden werden die qualitative Mobilität, welche die Fortbewegungs-Geschwindigkeit jedes Tieres erfasst, und die quantitative Mobilität, welche den prozentualen Anteil an spontan beweglichen Tieren in der Gruppe beschreibt.

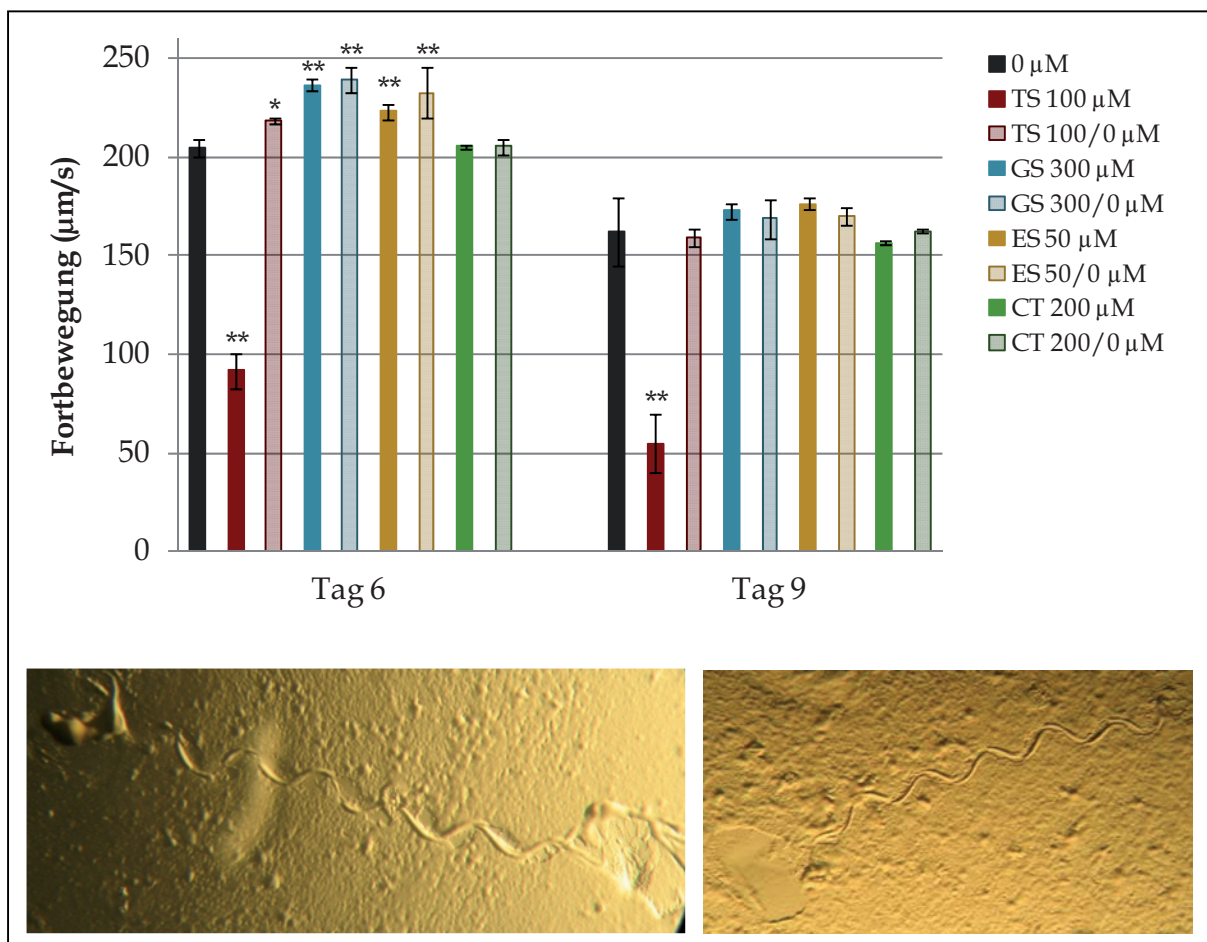


Abb. 16: Veränderung der qualitativen Mobilität unter Tannin-Einfluss

Am 6. und 9. Adult-Tag wurden die Längen der Kriechspuren nach definierten Zeiträumen ausgemessen. Dabei wurden Tannin-vorbehandelte Tiere sowohl auf substanzhaltigen Testplatten (TS 100 µM, GS 300 µM, ES 50 µM und CT 200 µM) als auch auf Kontrollplatten (TS 100/0 µM, GS 300/0 µM, ES 50/0 µM und CT 200/0 µM) getestet. Zusätzlich wurden auch die Spuren der unbehandelten Kontrolle (0 µM) vermessen. Jeder Balken repräsentiert die Fortbewegung von 90 Tieren in drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes und Unterschiede zur Kontrolle gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**). Die Fotos zeigen Beispielaufnahmen von ausgemessenen Kriechspuren.

Die Messung am 6. Adult-Tag zeigte, dass 100 µM TS einen starken, negativen Einfluss auf die Beweglichkeit der Tiere hatte. Sie bewegten sich im Vergleich zur Kontrolle wesentlich langsamer fort (Abb. 16). Dies scheint jedoch nicht an

mangelnder Fitness zu liegen, sondern vielmehr an der hohen Viskosität der Tanninsäure: Wurden die Tanninsäure-behandelten Nematoden auf substanzfreie Kontrollplatten gesetzt, so war die Fortbewegungs-Geschwindigkeit sogar signifikant erhöht. Auch bei Gallussäure- und Ellagsäure-behandelten Tieren konnte eine Steigerung der Fitness beobachtet werden, die sowohl auf Kontrollplatten als auch auf substanzhaltigen Platten ausgeprägt war. Catechin konnte im Gegensatz dazu zu keiner markanten Veränderung führen.

Am 9. Adult-Tag konnte keinerlei Fitness-Steigerung der Tannine festgestellt werden (**Abb. 16**). Die einzig signifikante Varianz verursachte Tanninsäure bei vorbehandelten Tieren auf substanzhaltigen Platten. Da auch in diesem Fall die reduzierte Beweglichkeit nicht auf substanzfreien Platten zu erkennen war, scheint erneut die hohe Viskosität von TS Ursache dieses Effektes zu sein.

Der Test zur quantitativen Mobilität ermöglicht eine Aussage über den Anteil an spontan beweglichen Tieren pro Platte (**Abb. 17**). Hier wird deutlich, dass sich Tanninsäure- und Gallussäure-behandelte Tiere häufiger bewegen als Kontrolltiere. Dieser Effekt tritt jedoch hauptsächlich in der ersten Lebenshälfte der Nematoden auf. Am 18. und 21. Adult-Tag ist nur noch ein nicht-signifikanter Trend bei TS-behandelten Tieren zu erkennen. GS übte sogar keinerlei Einfluss an diesen beiden Tagen aus. Interessanterweise konnte Ellagsäure an keinem Tag eine signifikante Veränderung verursachen. Catechin führte nur zu einem leichten Vorteil an Tag 9, übte sonst aber auch keinerlei Einfluss aus.

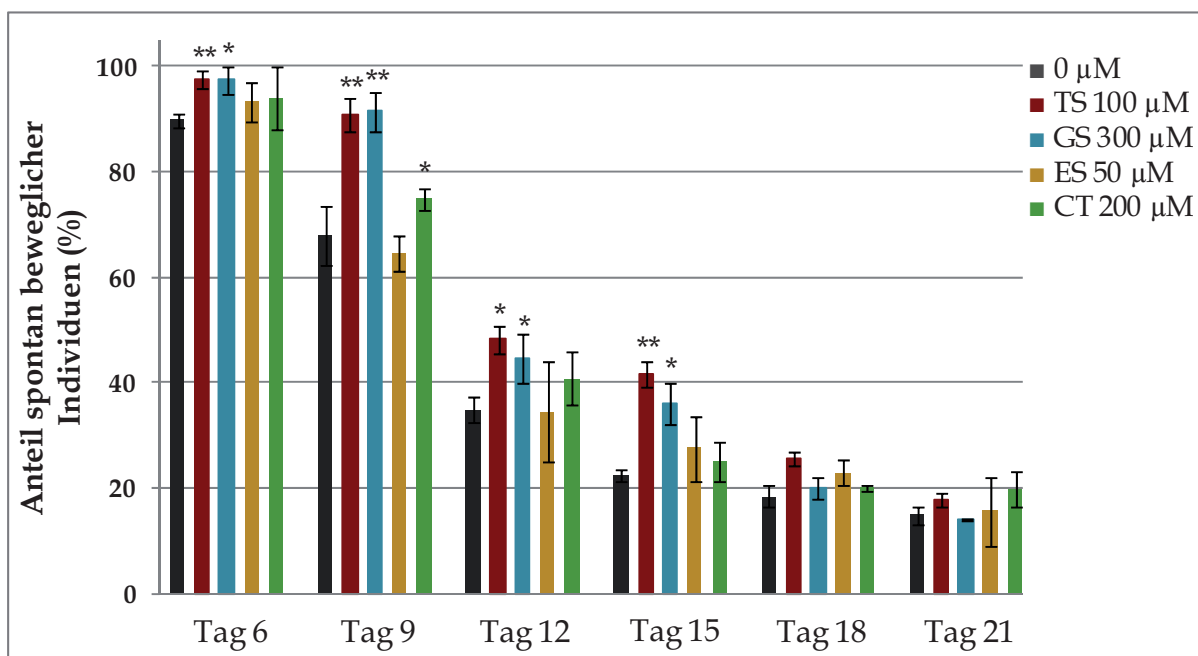


Abb. 17: Veränderung der quantitativen Mobilität unter Tannin-Einfluss

Am 6., 9., 12., 15., 18., und 21. Adult-Tag wurde der Anteil an spontan beweglichen Nematoden auf Kontroll- und Tanninplatten innerhalb eines Zeitraums von 15 Sekunden bestimmt. Die Balken repräsentieren zwei unabhängige Versuche mit je 100 Tieren pro Konzentration und Versuch. Tote Tiere wurden nicht gezählt, so dass sich die Gesamtzahl im Verlauf verringert hat. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes und Unterschiede zur Kontrolle gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

Die pharyngeale Pumpfrequenz, gemessen als Kontraktionen pro 15 Sekunden, ist sowohl ein nützlicher Parameter zur Detektion einer veränderten Nahrungsaufnahme als auch zur Einschätzung der körperlichen Fitness. Es konnte gezeigt werden, dass die pharyngeale Pumpfrequenz erwartungsgemäß stark mit dem Alter sinkt, wobei jedoch Tanninsäure und Ellagsäure an keinem Tag zu einer Veränderung der Pumpfrequenz führen konnten (**Abb. 18**). Gallussäure hingegen erzielte eine Erhöhung an allen drei Tagen, wobei sich die Erhöhung nur am 9. Adult-Tag als signifikant erwies. Catechin konnte als einziges Tannin die Pumpfrequenz an allen drei getesteten Tagen signifikant steigern.

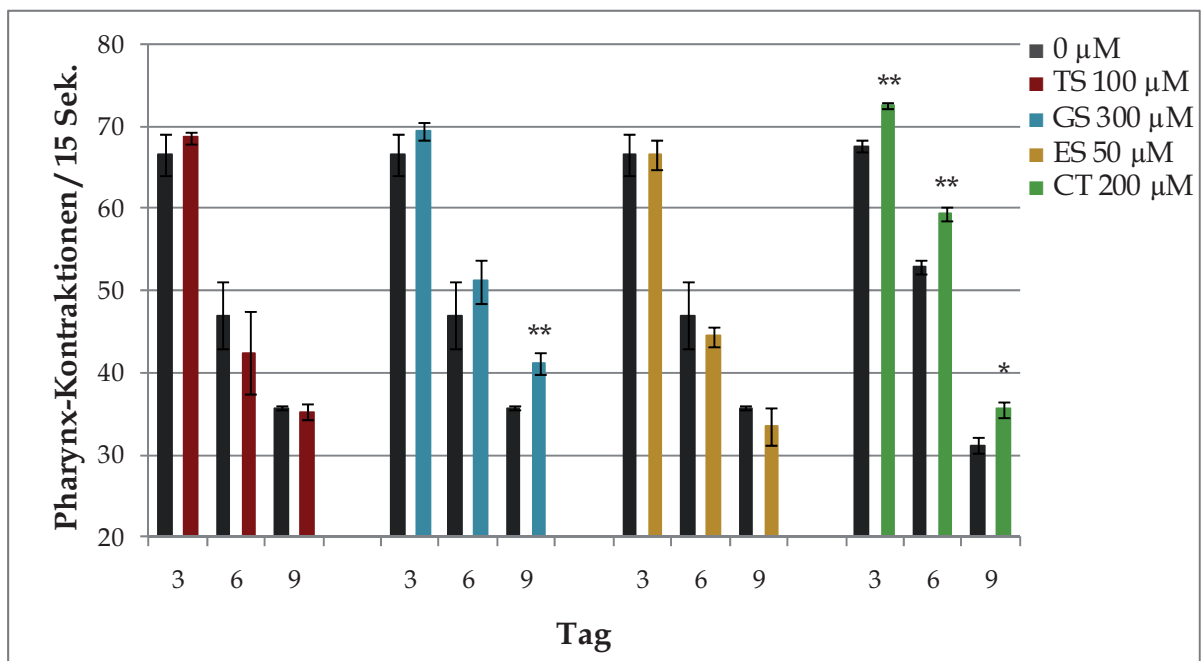


Abb. 18: Der Effekt von Tanninen auf die Pharynx-Pumpfrequenz

Am 3., 6., und 9. Adult-Tag wurde die Pumpfrequenz des Pharynx 15 Sekunden lang beobachtet. Die Balken repräsentieren die mittlere Pumpfrequenz von drei unabhängigen Versuchen und je 30 Tieren, deren Pumpfrequenz jeweils dreimal gezählt wurde. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes und Unterschiede zur Kontrolle gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

Die Attraktion zu einer Substanz kann Hinweise geben, ob die Tiere in ihrem natürlichen Lebensraum die Substanz zu sich nehmen würden. Darüber hinaus könnte eine sehr geringe Attraktion zu verringerter Nahrungsaufnahme unter Laborbedingungen und somit zu einem CR-Effekt führen. Dies scheint jedoch nicht auf 100 μM TS oder auf 300 μM GS zuzutreffen. Beide Tannine übten eine verstärkte Attraktion auf Nematoden aus, so dass sich relativ zur Kontrolle signifikant mehr Nachkommen in den tanninhaltigen Bakterien befanden (**Abb. 19**). Ein anderes Bild zeichnete sich für Ellagsäure ab. Nematoden schienen diesem Tannin gegenüber eine leichte Aversion entwickelt zu haben, so dass sich mehr Nachkommen in den Kontrollbakterien befanden. Einzig Catechin führte zu keiner signifikanten Variation.

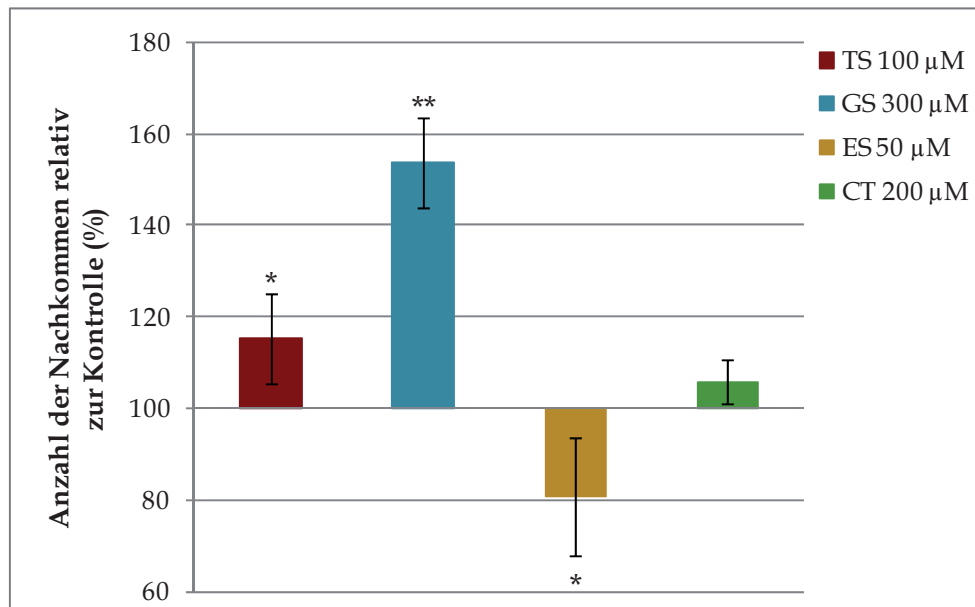


Abb. 19: Attraktion der Tannine

Je eine unbehandelte L1-Larve wurde auf einen von sechs alternierenden Bakterientropfen (tanninhaltig bzw. tanninfrei) einer großen Platte gesetzt. Die Anzahl der Nachkommen innerhalb 96 Stunden für alle drei Kontroll-Tropfen entspricht 100%. Die Nachkommen der Tannin-Tropfen wurden in Relation dazu aufgetragen und jeder Balken entspricht dem Mittel von 12 Testplatten. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes und Unterschiede zur Kontrolle gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

Da eine geringe Fettspeicherung mit einem längeren Leben assoziiert ist (Xie, 2008), wurde der Triglyzeridgehalt behandelter und unbehandelter Tiere verglichen. Dabei zeigte sich, dass alle Tannin-behandelten Tiere einen geringeren Triglyzeridgehalt besaßen, als die Kontrolle (**Abb. 20**). Während die Kontrolle einen Gehalt von knapp 5 µg Triglyzerid pro mg Protein aufwies, wurde bei allen Tannin-behandelten Proben ein Gehalt unter 4 µg/mg festgestellt. Jedoch erwies sich nur die Triglyzerid-Reduktion durch 100 µM TS als signifikant, was sicherlich eine Folge der kleinen Fallzahl von zwei Experimenten ist.

Polyphenole können ihre antioxidative Kapazität prinzipiell durch mindestens zwei verschiedene Verfahren realisieren. Zum Einen können sie direkt auf Oxidantien und freie Radikale wirken und sie unschädlich machen, zum Anderen können sie die Produktion von antioxidativ-wirkenden Metaboliten und Enzymen eines Individuums aktivieren. Beide Möglichkeiten wurden bei der TOSC-Analyse in Betracht gezogen und analysiert. Zunächst wurde die antioxidative Kapazität der Einzelsubstanzen als Ascorbinsäure-Äquivalenz bestimmt. Auch für das Lösungsmittel DMSO wurde diese Kapazität ermittelt und sollte von den Substanz-Kapazitäten subtrahiert werden. Das antioxidative Potential von DMSO war jedoch so gering, dass mit dieser Methode keine Werte ermittelt werden konnten.

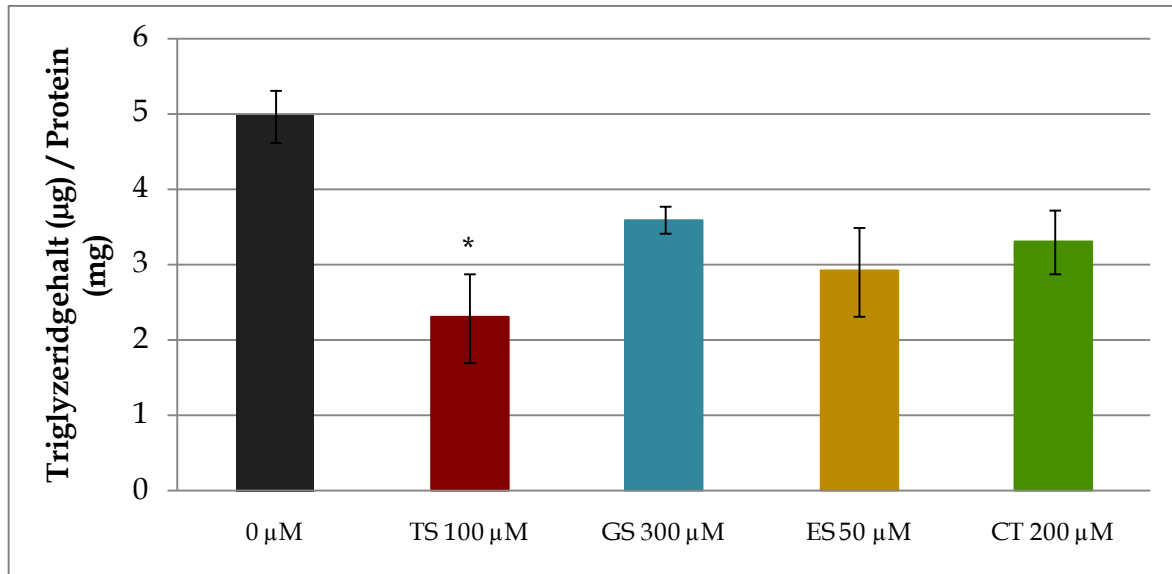


Abb. 20: Triglyzeridgehalt Tannin-behandelter Nematoden

Jungadulte behandelte und unbehandelte Tiere wurden geerntet, homogenisiert und der Triglyzeridgehalt nach erfolgter Hydrolysierung photometrisch bestimmt. Die Werte wurden anhand des Proteingehalts normalisiert. Jeder Balken repräsentiert zwei unabhängige Experimente und die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes. Unterschiede zur Kontrolle gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

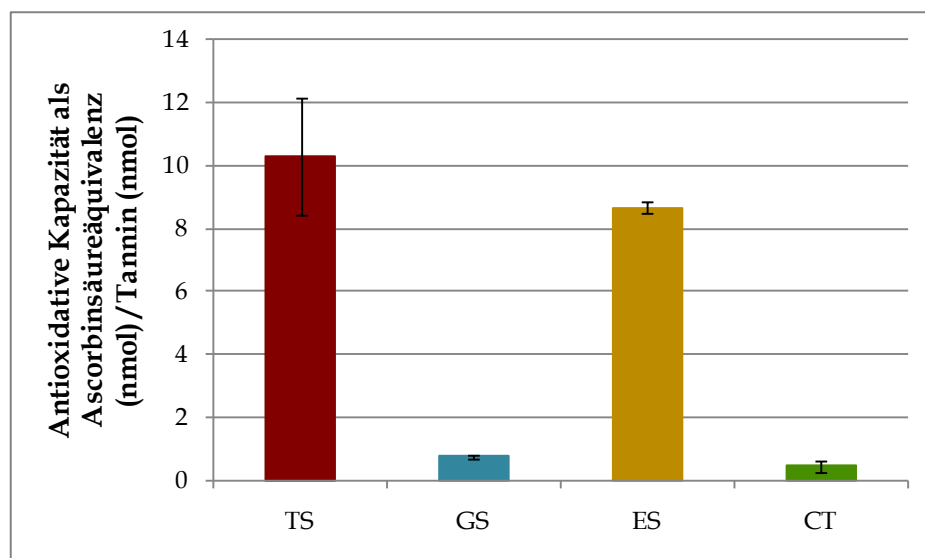


Abb. 21: Antioxidative Kapazität der Tannine

Mittels TOSC-Analyse wurde die antioxidative Kapazität der vier Tannine bestimmt. Angegeben ist die Kapazität als Ascorbinsäure-äquivalente Kapazität pro nmol Tannin. Die Balken repräsentieren jeweils drei unabhängige Experimente und die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

Besonders stark erwies sich der antioxidative Effekt bei Ellagsäure und Tanninsäure. Gallussäure und Catechin wiesen im Vergleich nur wenig antioxidative Kapazität auf (Abb. 21).

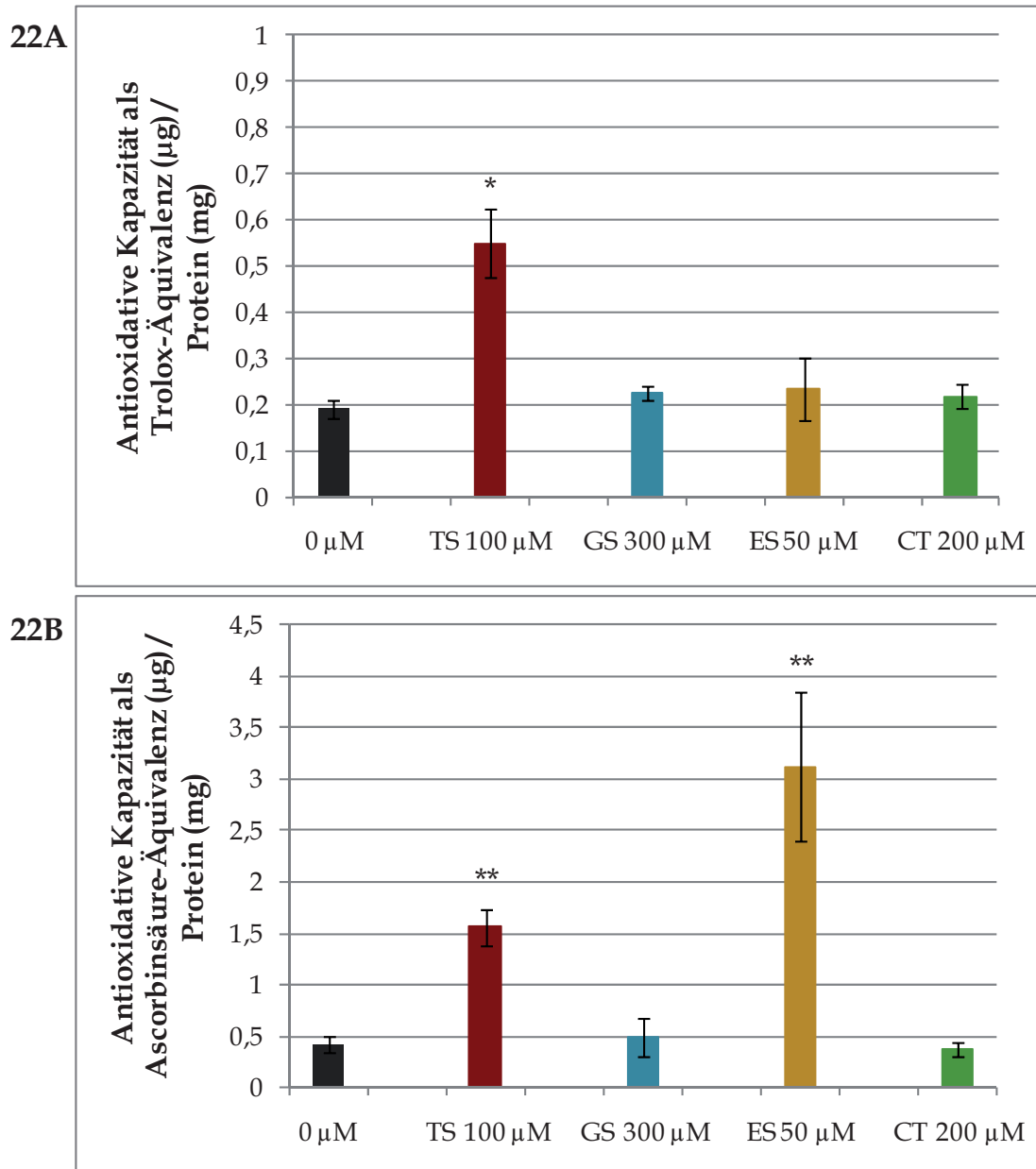


Abb. 22: TOSC-Analyse von Tannin-behandelten Nematoden

Das Homogenat behandelter und unbehandelter Tiere wurde mittels TOSC-Analyse ausgewertet. Dabei wurde die antioxidative Kapazität von lipidlöslichen (A) und wasserlöslichen (B) Metaboliten ermittelt. Die Kapazität wurde als Trolox- bzw. Ascorbinsäure-Äquivalenz pro mg Protein bestimmt. Die Balken repräsentieren jeweils drei unabhängige Experimente und die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes. Unterschiede zur Kontrolle gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

Um zu überprüfen, ob die Tannine zur Bildung von antioxidativen Metaboliten anregen, wurden Nematoden bis zum jungadulten Stadium mit den Tanninen inkubiert, geerntet und homogenisiert. Das antioxidative Potential wurde sowohl für lipidlösliche (angegeben als Trolox-Äquivalenz, **Abb. 22A**) als auch für wasserlösliche (angegeben als Ascorbinsäure-Äquivalenz, **Abb. 22B**) Metabolite bestimmt. Prominente Beispiele antioxidativer Metabolite sind Glutathion (wasserlöslich) und Ubichinon (lipidlöslich). Tanninsäure konnte als einziges Tannin

eine signifikante Erhöhung der antioxidativen Kapazität in der lipidlöslichen Phase erwirken (**Abb. 22A**). Gallussäure, Ellagsäure und Catechin konnten nur eine sehr geringe und nicht signifikante Steigerung der antioxidativen Kapazität in der lipidlöslichen Phase erreichen. Ein etwas anderes Bild zeigt die antioxidative Kapazität der wasserlöslichen Phase (**Abb. 22B**). Hier zeigten insbesondere Ellagsäure aber auch Tanninsäure eine positive Beeinflussung der Kapazität, wohingegen Catechin und Gallussäure erneut kaum eine Veränderung bewirkt hatten. Die positiven Ergebnisse von TS und ES müssen aber mit besonderer Vorsicht betrachtet werden. Während es zur Bestimmung der Kapazität der lipidlöslichen Phase weiterer Verarbeitungsschritte bedarf, ist dies für die wasserlösliche Fraktion nicht nötig. Daher können sich insbesondere in dieser Fraktion noch Spuren der Testsubstanzen befinden, die beim Waschvorgang nicht entfernt werden konnten. Da insbesondere TS und ES über hohe Präzipitationseigenschaften verfügen, sind diese Tannine vermutlich am schwierigsten zu eliminieren, was die hohe antioxidative Kapazität der TS und ES behandelten Tiere in der wasserlöslichen Fraktion erklärt. Diese Vermutung wird auch optisch untermauert. So zeigen TS-behandelte Tiere eine strukturelle Dunkelfärbung des Körpers (**Abb. 23**), welche durch Akkumulation von TS hervorgerufen werden könnte. Insbesondere anterior im Bereich des Pharynx (Pfeile) ist der Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ersichtlich. Der Waschvorgang für die Messung der wasserlöslichen Phase kann die Substanzen im Inneren der Tiere nicht entfernen.



Abb. 23: Akkumulation von TS in Nematoden

Dargestellt sind je zwei Fotos von TS-behandelten (100 μ M) (**A**) und unbehandelten (**B**) Nematoden. Die Tiere befinden sich im 10. Adult-Tag und der Pharynx ist mit Hilfe von Pfeilen markiert.

3.6 Übersicht über die Veränderung der Lebensparameter

Zur besseren Veranschaulichung der durchgeführten Bioassays und der Veränderungen von Lebensparametern wurden die relevantesten Ergebnisse kurz zusammengefasst (**Abb. 24**). Dies ermöglicht einen direkten Vergleich der Tannine und der verschiedenen Bioassays untereinander.

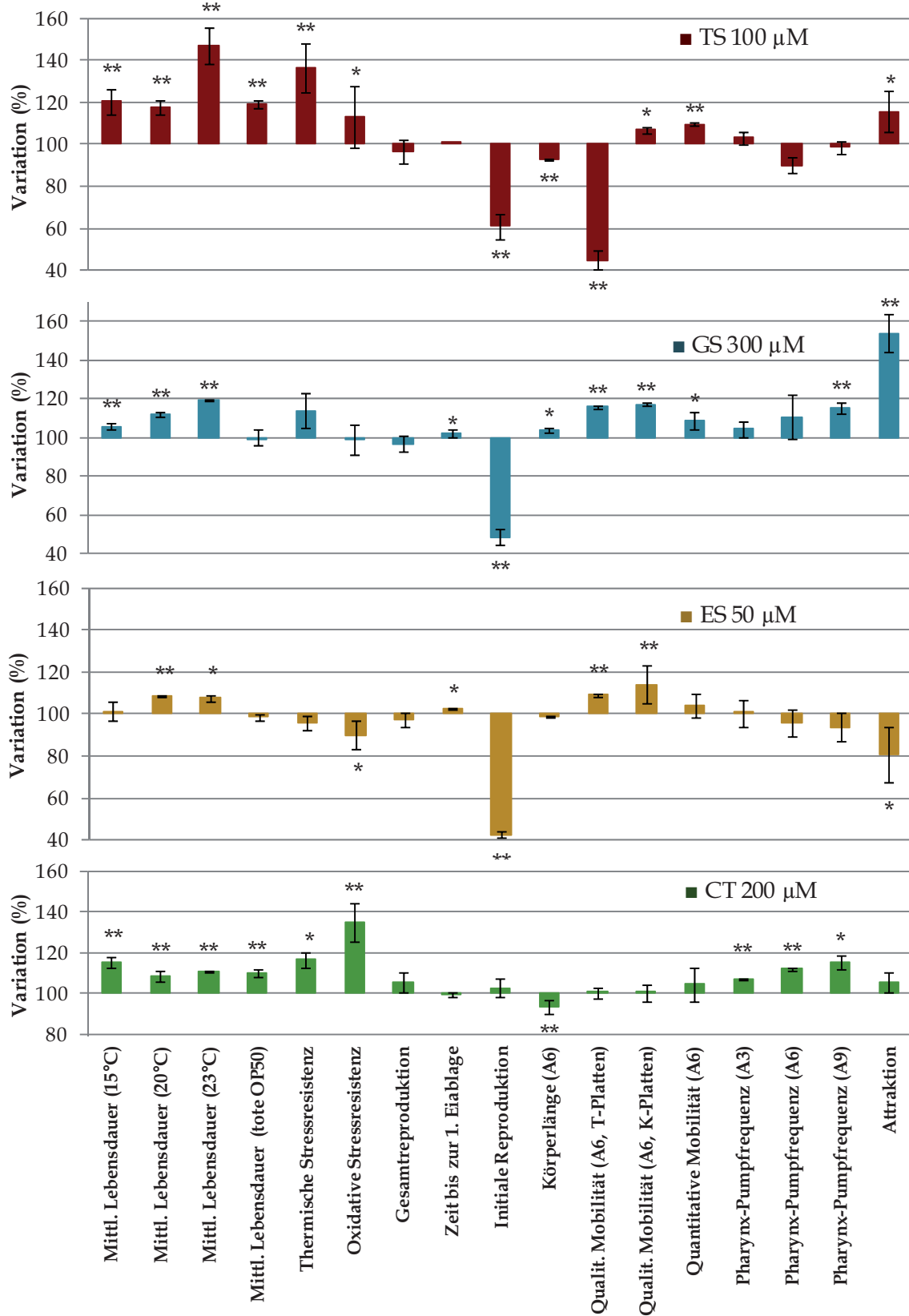


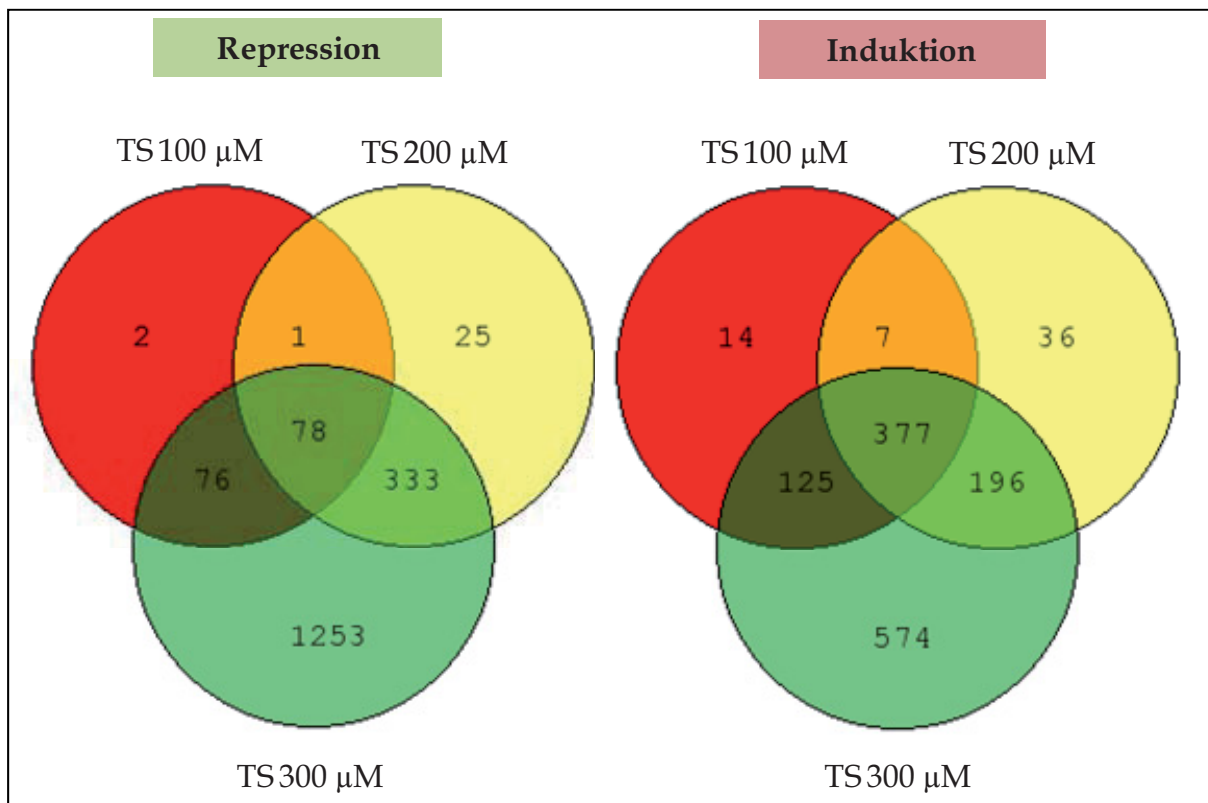
Abb. 24 (S. 63): Zusammenfassung der relevantesten Bioassays

Die relevantesten Ergebnisse der Bioassays wurden in dieser Abbildung zusammengefasst. Dargestellt sind die Veränderungen der mittleren Lebensdauer bei verschiedenen Temperaturen und unter Verwendung toter Bakterien bei 20°C, der Stresstoleranz, der Reproduktion, der Körperlänge, der Mobilität, der Pharynx-Pumpfrequenz als auch der Attraktion. Die Daten basieren auf den zuvor vorgestellten Ergebnissen und werden jeweils in Relation zur Kontrolle (100%) angegeben. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes. Unterschiede zur Kontrolle gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

Abkürzungen: Mittl. = Mittlere; A3 = 3. Adult-Tag; A6 = 6. Adult-Tag; A9 = 9. Adult-Tag; Qualit. = Qualitative; T-Platten = Tanninhaltige Platten; K-Platten = Kontrollplatten

3.7 Veränderung des Genexpressionsmusters nach Tanninsäure-Exposition

Die Genexpression von jungadulten Tieren wurde nach Exposition von 0 μM , 100 μM , 200 μM und 300 μM Tanninsäure mit Hilfe eines gesamtgenomischen Microarrays bestimmt. Tanninsäure wurde für diese sehr kostenintensive Untersuchung als einziges Tannin ausgewählt, da es die stärksten lebensverlängernden Eigenschaften aufwies, welche sich zudem nicht durch antimikrobielle Kapazitäten erklären lassen. **Abbildung 25** zeigt eine Übersicht über die Anzahl herunterregulierter (Repression) und hochregulierter (Induktion) Gene im Vergleich zur Kontrolle (0 μM).

**Abb. 25:** Anzahl differentiell exprimierter Gene nach Tannin-Exposition

Die Genexpression von TS-behandelten und unbehandelten Tieren wurde verglichen. Die Zahlen entsprechen der Anzahl der Gene, deren Expressionen im Vergleich zur Kontrolle 1,25-fach erhöht oder erniedrigt sind. Diesem Venn-Diagramm ist zu entnehmen, wie viele Gene in mehreren Konzentrationen differentiell exprimiert worden sind, und wie viele nur in einer oder zwei Konzentrationen beeinflusst worden sind.

Deutlich zu erkennen ist, dass die Anzahl differentiell exprimierter Gene mit Erhöhung der Konzentration steigt. TS 300 μM bewirkte eine Veränderung der Genexpression von insgesamt 3012 Genen, wobei über die Hälfte davon (1827 Gene) nicht durch TS 100 μM und TS 200 μM beeinflusst werden konnten. 455 Gene wurden in allen drei Konzentrationen differentiell exprimiert. Die effektivste lebensverlängernde Konzentration, TS 100 μM , bewirkte eine Regulierung von 157 (reprimiert) und 523 (induziert) Genen. Nur 16 Gene davon sind nicht durch andere Konzentrationen reguliert worden.

Um einen Überblick über die Prozesse zu erhalten, die am stärksten von Tanninsäure beeinflusst wurden, eignet sich die GO-Analyse. Die Funktionen der Gene werden in drei Hauptbereiche eingeteilt, biologischer Prozess (BP) zelluläre Komponente (ZK) und molekulare Funktion (MF), welche sich in weitere Unterbereiche gliedern. 100 μM TS beeinflusste hauptsächlich Genexpressionen, die biologische Prozesse regulieren (Abb. 26). Insbesondere Entwicklungs- und Wachstumsprozesse waren davon betroffen.

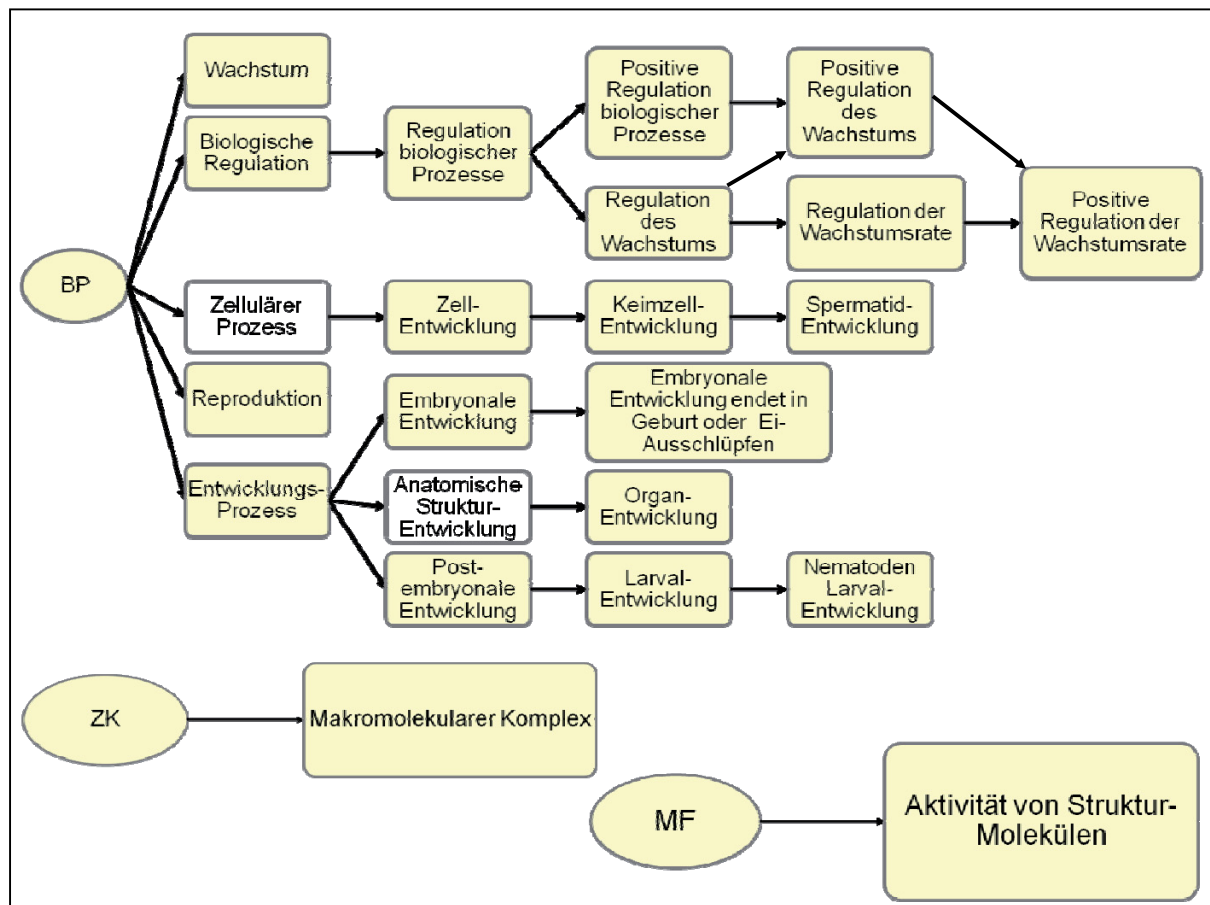


Abb. 26: GO-Analyse der Variation der Genexpression durch 100 μM TS

Die drei Hauptbereiche der Gen-Ontologie (Oval) und die durch 100 μM TS signifikant veränderten Unterbereiche (Rechteck) werden hier schematisch dargestellt. Die Farben entsprechen dem Signifikanz-Niveau nach folgendem Farbschema (bezogen auf den p-Wert):

$> 10^{-3}$ 10^{-3} bis 10^{-5} 10^{-5} bis 10^{-7} 10^{-7} bis 10^{-9} $< 10^{-9}$

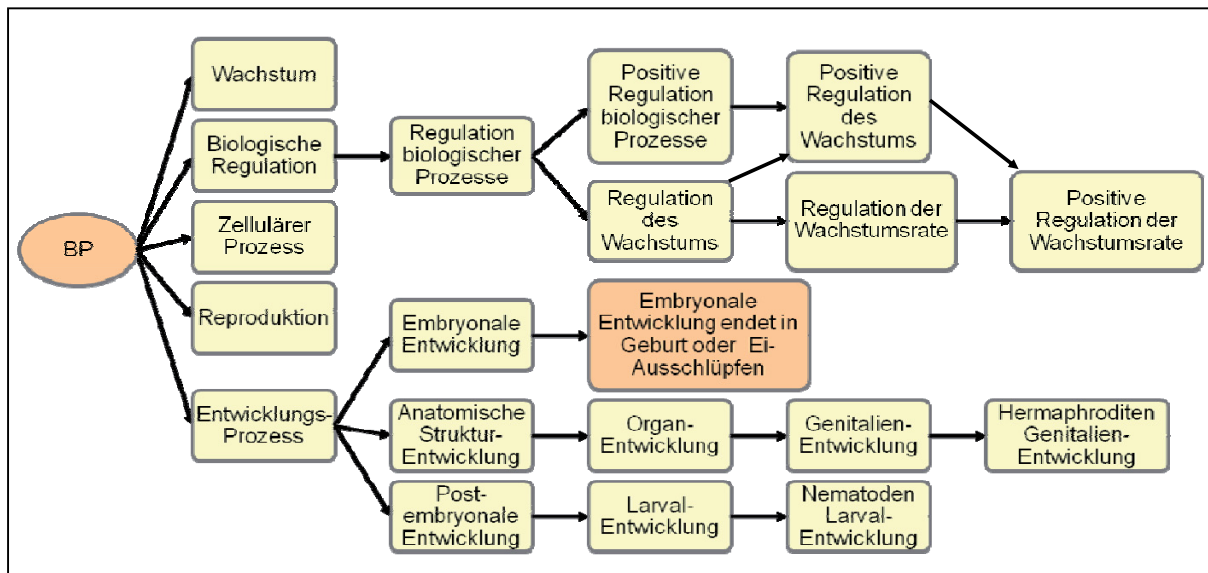


Abb. 27: GO-Analyse der Variation der Genexpression durch 200 μM TS

Der Hauptbereich der Gen-Ontologie „Biologischer Prozess“ (Oval) und die durch 200 μM TS signifikant veränderten Unterbereiche (Rechteck) werden hier schematisch dargestellt. In den Bereichen „Zelluläre Komponente“ und „Molekulare Funktion“ wurde das Signifikanz-Minimum nicht erreicht, so dass diese hier nicht aufgeführt wurden. Die Farben entsprechen dem Signifikanz-Niveau nach folgendem Farbschema (bezogen auf den p-Wert):

$> 10^{-3}$ 10^{-3} bis 10^{-5} 10^{-5} bis 10^{-7} 10^{-7} bis 10^{-9} $< 10^{-9}$

200 μM TS bewirkte eine ähnliche Verteilung der Genexpressions-Veränderungen im Vergleich zu 100 μM TS (Abb. 27). Auch hier sind die meisten Veränderungen im Bereich der Entwicklung und des Wachstums zu verzeichnen. Jedoch sind im Gegensatz zu 100 μM TS die GO-Terme ZK und MF und die Keimbahnentwicklung (BP) durch 200 μM TS nicht signifikant verändert worden. Die Beeinflussung durch 300 μM TS ist wesentlich breiter gestreut und erzielte höhere Signifikanz-Werte (Abb. 28). Auch hier stehen biologische Prozesse im Vordergrund, mit besonderem Fokus auf Entwicklungsprozesse und der Regulation des Wachstums. Nur unter Verwendung von 300 μM TS finden sich signifikante Veränderungen in den BP-Bereichen Fortbewegung und metabolischer Prozess. Auffällig sind auch die Variationen in den Sektoren Bindungs- und Ligase-Aktivität im Bereich MF, welche bei Verwendung der niederen Konzentrationen keine signifikante Rolle spielten.

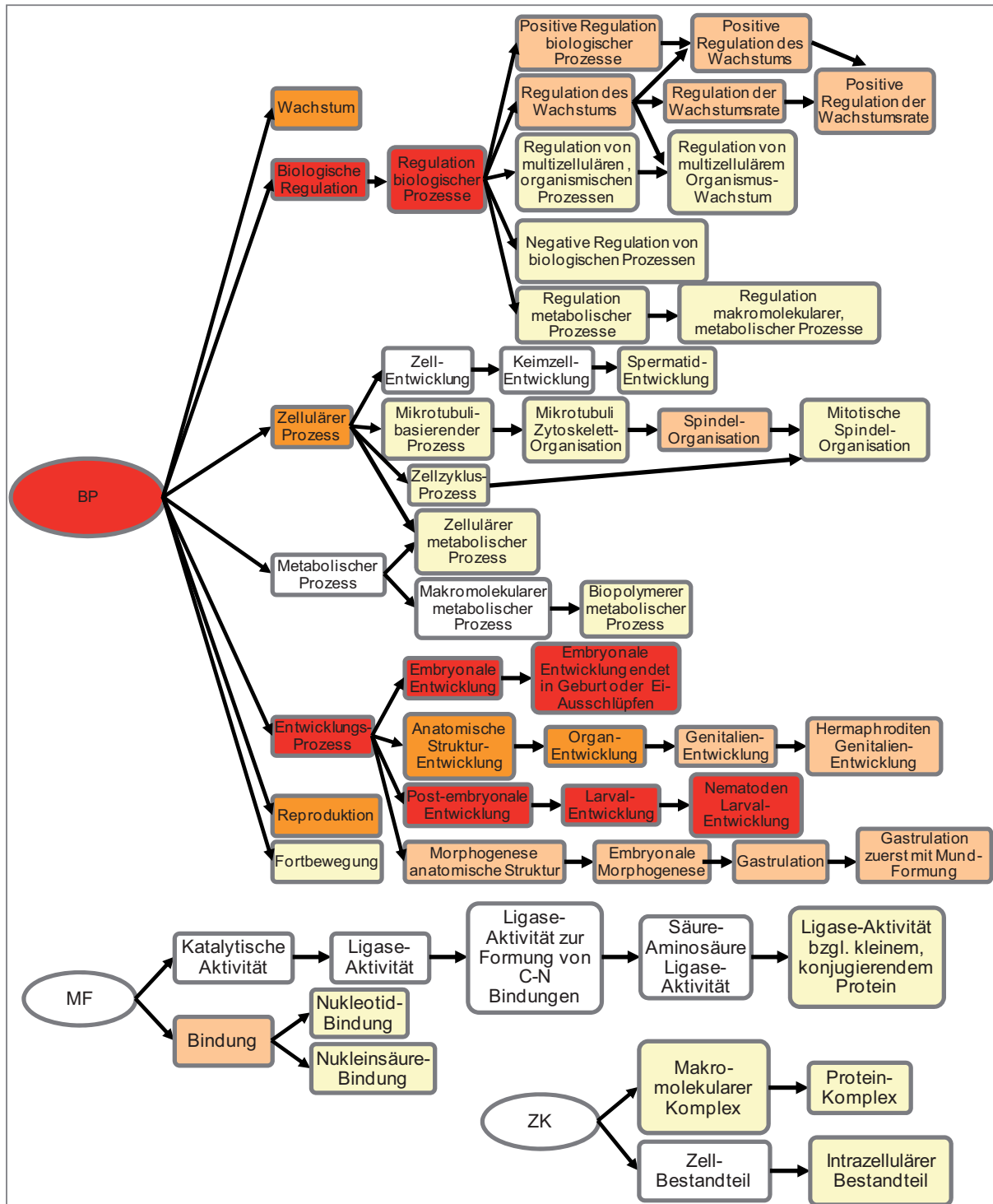


Abb. 28: GO-Analyse der Variation der Genexpression durch 300 µM TS

Die drei Hauptbereiche der Gen-Ontologie (Oval) und die durch 300 µM TS signifikant veränderten Unterbereiche (Rechteck) werden dargestellt. Die Farben entsprechen dem Signifikanz-Niveau nach folgendem Farbschema (bezogen auf den p-Wert):

$> 10^{-3}$ 10^{-3} bis 10^{-5} 10^{-5} bis 10^{-7} 10^{-7} bis 10^{-9} $< 10^{-9}$

Um die Veränderungen im Detail zu betrachten, wurden aus den rund 20.000 Genen, die auf dem Genom-Array vertreten sind, die interessantesten differentiell exprimierten Gene ausgewählt. Als Selektionskriterien dienten i) auffällig starke Induktionen oder Repressionen einzelner Gene ii) Gengruppen, die besonders häufig von Expressions-Variationen betroffen sind iii) Gene, die dosisabhängig unterschiedlich exprimiert werden und iv) Gene, die in der Lebensdauerlimitation, Stressantwort und Alterung involviert sind. Als Grenzwert wurde eine 1,25-fache Hoch- bzw. Runterregulierung der Expression im Vergleich zur Kontrolle festgelegt. Befanden sich mehrere Spots eines Gens auf dem Array, so wurden die Werte gemittelt. Zunächst wurden Gengruppen selektiert, deren Genmitglieder besonders häufig durch Tanninsäure beeinflusst wurden (**Tab. 6**). In dieser Aufstellung befinden sich die Namen der Gengruppen (inklusive der Bedeutung der Abkürzung) und je drei Genbeispiele mit der erfassten Genexpression im Vergleich zur Kontrolle (die Genexpression der Kontrolle wurde als 1,00 festgesetzt). Die weiteren differentiell exprimierten Gene der jeweiligen Gengruppe wurden ebenso notiert, wie eine kurze Beschreibung der Gengruppe, welche auf Angaben der Nematoden-Web-Plattform „WormBase“ (www.wormbase.org) basieren, sofern nicht anders angegeben. Drei Gengruppen mit Spermien-spezifischen Funktionen (*msp*, *spe* & *ssp/q/s*) wurden durch alle Tanninsäure-Konzentrationen hochreguliert, wobei 300 μ M TS die stärksten Effekte verursachte. Die bislang nicht charakterisierte Gruppe der Nematoden-spezifischen Peptid-Familie als auch eine Vielzahl von Kollagen-Genen zeigten ein ähnliches Expressionsmuster. Interessant ist, dass mehrere *abu*-Gene stark durch 300 μ M TS induziert wurden, wobei 100 und 200 μ M kaum Einfluss auf die Genexpression hatten. ABU-Proteine helfen bei der richtigen Faltung von Proteinen und werden insbesondere bei Unterdrückung der UPR („Unfolded Protein Response“ bzw. Ungefaltete-Protein-Antwort) synthetisiert. Durch Herunterregulierung vieler *dnj*-Gene könnte diese Blockierung der UPR ausgelöst worden sein. Auch diese Gengruppe wird insbesondere unter Verwendung von 300 μ M TS reguliert, so dass ein Zusammenhang zwischen der Induktion der *abu*-Gene und der Repression der *dnj*-Gene durchaus plausibel erscheint. Zudem sind verschiedene der Dauerformation-regulierenden *daf*-Gene, die Stress-induzierbaren Vitellogenine als auch die an der Embryonalentwicklung beteiligten Gengruppen *mcm* und *mex* reprimiert, wobei auch hier 100 und 200 μ M TS nur schwache Auswirkungen zeigten.

In **Tabelle 7** sind die interessantesten Expressions-Veränderungen einzelner Gene erfasst. Cadmium-induzierbaren Genen kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, da die mit großem Abstand stärkste Induktion (rund 76-, 96 bzw. 262-fache Erhöhung der Expression bei 100, 200 bzw. 300 μ M TS) bei dem Cadmium-induzierbaren Gen *numr-1* festgestellt wurde. Auch das bislang nicht charakterisierte Gen *B0024.4*, welches ebenfalls eine erhöhte Expression nach Cd-Einfluss aufwies (Cui et al., 2007), konnte durch TS induziert werden. Eine herstellungsbedingte Cd-

Kontamination der Tanninsäure erscheint jedoch als sehr unwahrscheinlich, da weitere Cd-induzierbare Gene wie *mtl-1*, *mtl-2* und *numr-2* keine erhöhte Expression nach TS-Exposition aufwiesen.

Einige stark hochregulierte Gene wurden ausgewählt und in **Tabelle 7** aufgeführt. Darunter sind zwei kaum charakterisierte Gene (*W03G1.5* & *Y69A2AR.19*), die bei Ausschaltung durch RNAi (RNA-Interferenz) eine erhöhte Lebensdauer und verbesserte Paraquatresistenz bewirken. Die hohe Expression dieser Gene unter TS-Einfluss und die lebensverlängernde Eigenschaft von TS erscheinen daher widersprüchlich. Sehr starke Induktionen konnten auch bei den wenig charakterisierten Genen *T19D12.4*, *ttr-27* und *C54D10.10* festgestellt werden. Der RNAi-Phänotyp von *T19D12.4* lässt darauf schließen, dass die Hochregulierung dieses Gens zu einer verbesserten Pathogenabwehr führen könnte. Die Induktion von *sodh-1* könnte eine Folge des antinutritiven Effektes von TS sein, da dieses Gen auch bei Verwendung von CR-auslösender, axenischer Kultur induziert wird. Das ABC-Transporter-Protein PGP-14 spielt vermutlich eine Rolle bei der Ausschleusung von Toxinen aus der Zelle und trägt somit potentiell auch zur Stressabwehr bei. Die Induktion der Genexpression von *pgp-14* durch TS könnte somit zur erhöhten Stressresistenz in TS-behandelten Tieren beitragen.

Die interessantesten, herunterregulierten Gene wurden ebenfalls in **Tabelle 7** zusammengefasst. Hier sind die aufgezeigten RNAi-Phänotypen von besonderem Interesse, da die Repression der Genexpression zu ähnlichen Erscheinungsbildern führen kann. Potentiell an der Lebensverlängerung beteiligt könnten demzufolge die Gene *glp-1*, *pup-2*, *pes-2.1* und *asm-3* sein. Auch eine Wachstumshemmung, wie sie bei 100 µM TS beobachtet wurde, könnte ursächlich mit der Lebensverlängerung im Sinne der „Disposable Soma Theory“ zusammenhängen. Daher ist die Repression von *cav-1*, *skr-9* und *lin-41* potentiell mitverantwortlich für den Phänotyp der TS-exponierten Tiere. Die Repression von *hlh-2* könnte zu einer Verminderung der Apoptose-Rate führen und so der Alterung entgegenwirken. Die stark verminderte Expression von *cht-1* und *clcc-266* hingegen kann bislang nicht interpretiert werden.

Tabelle 6: Veränderung der Genexpression durch Tanninsäure in verschiedenen Gengruppen

Gengruppe	Veränderung der Genexpression ^a				Funktionen & Charakteristika der Gengruppe und der codierten Proteine	Weitere Gene der Gruppe mit ähnlichem Expressionsmuster
	Gen	TS 100 μM	TS 200 μM	TS 300 μM		
<i>abu</i> (Activated in Blocked Unfolded protein response)	<i>abu-1</i> <i>abu-7</i> <i>abu-11</i>	1,04 1,20 1,23	0,94 0,99 1,10	4,56 5,60 5,72	<ul style="list-style-type: none"> • Schutz vor ungefalteten Proteinen • Induzierbar durch Blockierung der ungefalteten-Protein-Antwort im ER 	<i>abu-5, abu-6, abu-8, abu-9, abu-10</i>
<i>col</i> (COLlagen)	<i>col-49</i> <i>col-137</i> <i>col-156</i>	1,53 1,75 1,50	1,29 1,54 1,32	5,03 6,83 7,30	<ul style="list-style-type: none"> • Bestandteil der extrazellulären Matrix • Aufbau der Kutikula • Beeinflussung von Morphologie, Entwicklung und Fortbewegung 	<i>col-3, col-10, col-12, col-13, col-14, col-17, col-34, col-38, col-39, col-48, col-58, col-60, col-62, col-63, col-65, col-66, col-70, col-71, col-73, col-77, col-79, col-81, col-88, col-90, col-91, col-97, col-104, col-107, col-109, col-111, col-113, col-115, col-118, col-120, col-126, col-130, col-138, col-139, col-144, col-145, col-147, col-149, col-150, col-152, col-153, col-154, col-155, col-157, col-159, col-161, col-166, col-167, col-168, col-173, col-174, col-175, col-180, col-182, col-186</i>
<i>nspa, nspb & nspd</i> (Nematode Specific Peptide family, group A, B & D)	<i>nspa-9</i> <i>nspb-12</i> <i>nspd-7</i>	2,30 1,66 1,92	2,47 1,77 1,57	2,68 9,43 3,53	<ul style="list-style-type: none"> • Nicht charakterisiert 	<i>nspa-1, nspb-1, nspb-2, nspb-3, nspb-6 nspb-10, nspb-11, nspd-1, nspd-2, nspd-3, nspd-4, nspd-5, nspd-6, nspd-9</i>
<i>msp</i> (Major Sperm Protein)	<i>msp-142</i> <i>msp-74</i> <i>msp-152</i>	2,01 1,81 1,76	1,91 1,82 1,81	2,93 2,67 2,18	<ul style="list-style-type: none"> • Häufigste Spermien-Proteine • Involviert in extrazellulärer Signalweitergabe und Spermien Motilität • Zytoskelettale Funktion • Erhöhte Expression nach Hitzeschock (GuhaThakurta et al., 2002) 	<i>msp-3, msp-10, msp-19, msp-31, msp-32, msp-33, msp-36, msp-38, msp-40, msp-45, msp-49, msp-50, msp-51, msp-53, msp-55, msp-56, msp-57, msp-59, msp-63, msp-64, msp-65, msp-76, msp-77, msp-78, msp-79, msp-81, msp-113</i>

Fortsetzung Tabelle 6

<i>spe</i> (defective SPERMATOGENESIS)	<i>spe-10</i> <i>spe-11</i> <i>spe-26</i>	1,40 2,21 1,92	1,45 2,26 1,82	2,96 4,19 4,18	<ul style="list-style-type: none"> • Relevant für die Spermatogenese 	<i>spe-4, spe-6, spe-8, spe-12, spe-15, spe-17, spe-19, spe-27, spe-38, spe-41</i>
<i>ssp, ssq, sss</i> (Sperm Specific family, class P, Q & S)	<i>ssp-16</i> <i>ssq-2</i> <i>sss-2</i>	1,73 1,45 1,59	1,75 1,45 1,71	3,31 2,55 3,36	<ul style="list-style-type: none"> • Sperma-spezifische Proteine 	<i>ssp-10, ssp-11, ssp-19, ssp-31, ssp-32, ssq-1, ssq-3, sss-1</i>
<i>daf</i> (abnormal Dauer Formation)	<i>daf-1</i> <i>daf-16</i> <i>daf-19</i>	0,64 0,81 0,86	0,74 0,96 0,98	0,48 0,69 0,53	<ul style="list-style-type: none"> • Regulierung des Dauerstadiums • Einfluss auf Lebensdauer, Wachstum & Reproduktion 	<i>daf-4, daf-12, daf-14, daf-15, daf-18</i>
<i>dnoj</i> (DNAJ domain)	<i>dnoj-26</i> <i>dnoj-28</i> <i>dnoj-11</i>	1,14 0,70 0,81	1,16 0,66 0,96	0,68 0,54 0,69	<ul style="list-style-type: none"> • Co-Chaperone • Relevant für die Zusammenführung von HSP70 mit Substraten 	<i>dnoj-5, dnoj-8, dnoj-9, dnoj-13, dnoj-17, dnoj-18, dnoj-19, dnoj-23, dnoj-25, dnoj-29, dnoj-30</i>
<i>mcm</i> (MiniChromosome Maintenance protein)	<i>mcm-2</i> <i>mcm-4</i> <i>mcm-6</i>	0,81 0,94 0,90	0,82 0,91 1,01	0,59 0,63 0,64	<ul style="list-style-type: none"> • Essentiell für DNA-Replikation & Zellteilung • Embryonal-Entwicklung 	<i>mcm-3, mcm-5, mcm-7</i>
<i>mex</i> (Muscle EXcess)	<i>mex-1</i> <i>mex-3</i> <i>mex-5</i>	0,79 0,66 0,74	0,89 0,87 0,81	0,44 0,47 0,49	<ul style="list-style-type: none"> • Embryonal-Entwicklung • Relevant für Zellschicksal-Spezifizierung • Regulierung der Anzahl embryonaler Muskel-Zellen 	<i>mex-2 (efl-1), mex-4 (dpl-1), mex-6</i>
<i>vit</i> (VITellogenin structural genes)	<i>vit-1</i> <i>vit-5</i> <i>vit-3</i>	0,91 0,88 0,71	0,92 0,90 0,67	0,59 0,62 0,45	<ul style="list-style-type: none"> • Induzierbar durch Stress, insbesondere durch Endokrine Disruptoren • Vorläufer der Eidotter-Proteine 	<i>vit-2, vit-4, vit-6</i>

^a Veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Expression=1,00)

Farbschema: 1,25-2,50, 2,51-5,00, ≥ 5,01, 0,80-0,65, 0,64-0,50, ≤ 0,49

Tabelle 7: Variation der Genexpression einzelner Gene nach TS-Exposition

Gen	Veränderung der Genexpression ^a				Funktionen & Charakteristika des Gens und des codierten Proteins	RNAi Phänotyp / Phänotyp von Mutantenstämmen
	TS 100 µM	TS 200 µM	TS 300 µM	TS 300 µM		
Cadmium(Cd)-induzierbare Gene						
<i>numr-1</i> (NUclear localized Metal Responsive)	75,71	95,84	261,92		<ul style="list-style-type: none">Vermittelt Cd-ResistenzInduzierbar durch Cd	<ul style="list-style-type: none">Veränderte embryonale & postembryonale Entwicklung
<i>numr-2</i> (NUclear localized Metal Responsive)	0,98	0,99	1,00			
<i>mtl-1</i> (MeTaLlothionein)	0,76	0,56	0,62		<ul style="list-style-type: none">Regulation durch DAF-16Induzierbar durch Cd & HitzeBeteiligt an Metall-Detoxifikation	<ul style="list-style-type: none">Cd-hypersensitivVerringertes WachstumVerringerte Reproduktion
<i>mtl-2</i> (MeTaLlothionein)	0,86	0,81	0,83			
<i>B0024.4</i>	3,75	4,30	7,24		<ul style="list-style-type: none">Erhöhte Expression nach Cd- Exposition (Cui et al., 2007)	<ul style="list-style-type: none">Cd-hypersensitivLangsames Wachstum
Erhöhte Expression durch TS-Behandlung						
<i>W03G1.5</i>	6,40	9,82	10,07		<ul style="list-style-type: none">Uncharakterisiert	<ul style="list-style-type: none">ParaquatresistenzErhöhte Lebensdauer
<i>Y69A2AR.19</i>	2,52	2,85	5,85		<ul style="list-style-type: none">Erhöhte Expression unter Clofibrat-Exposition (Reichert & Menzel, 2005)	
<i>pgp-14</i> (P-GlycoProtein related)	2,00	2,94	4,93		<ul style="list-style-type: none">TransmembranproteinABC-TransporterHomologien zur MDR- (Multidrug Resistance) Familie bei Vertebraten	<ul style="list-style-type: none">Fehlendes Darm-Granulat in Embryonen
<i>T19D12.4</i>	2,49	3,26	5,01		<ul style="list-style-type: none">Uncharakterisiert	<ul style="list-style-type: none">Erhöhte Pathogen-Sensitivität
<i>ttr-27</i> (TransThyretin-Related family)	4,90	5,03	7,46		<ul style="list-style-type: none">Uncharakterisiert	<ul style="list-style-type: none">Keine Auffälligkeiten
<i>C54D10.10</i>	3,34	2,71	11,50		<ul style="list-style-type: none">Endopeptidase-Inhibitor Aktivität	<ul style="list-style-type: none">Keine Auffälligkeiten
<i>sodh-1</i> (SOribitol DeHydrogenase family)	1,59	2,36	3,01		<ul style="list-style-type: none">Alkohol-DehydrogenaseErhöhte Expression in axenischer Kultur (Castelein et al., 2008)	<ul style="list-style-type: none">Leicht veränderte Lebensdauer

Fortsetzung Tabelle 7

Verringerte Expression durch TS-Behandlung			
<i>cav-1</i> (CAVeolin)	0,47 0,47 0,11	<ul style="list-style-type: none"> • Regulation von meiotischer Zell-Progression • Caveolen-Formation in der Plasmamembran • Verringerte Expression nach Diethylstilbestrol-, Fluoranthen- und Atrazin-Exposition (Reichert & Menzel, 2005) 	<ul style="list-style-type: none"> • Langsames Wachstum • Erhöhte Sensitivität gegenüber Levamisol, Aldicarb & Nikotin • Veränderte Ei-Ablage (Scheel et al., 1999)
<i>pes-2.1</i> (Patterned Expression Site)	0,65 0,55 0,33	<ul style="list-style-type: none"> • Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen • Lebensdauer-Determination 	<ul style="list-style-type: none"> • Veränderte Lebensdauer
<i>glp-1</i> (abnormal Germ Line Proliferation)	0,64 0,74 0,44	<ul style="list-style-type: none"> • Transmembran-Protein • Relevant für Zellschicksal-Spezifizierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Sterilität & Keimbahn-Tumore • Veränderte Morphologie • Verlängerte Lebensdauer • Langsames Wachstum
<i>pup-2</i> (Poly(U) Polymerase)	0,59 0,68 0,32	<ul style="list-style-type: none"> • Polymerase 	<ul style="list-style-type: none"> • Langsames Wachstum • Verlängerte Lebensdauer • Veränderte Entwicklung
<i>cht-1</i> (CHiTinase)	0,36 0,33 0,22	<ul style="list-style-type: none"> • Pathogenabwehr • Relevant für die Embryogenese 	<ul style="list-style-type: none"> • Embryonale Letalität
<i>clec-266</i> (C-type LECTin)	0,34 0,39 0,32	<ul style="list-style-type: none"> • Uncharakterisiert 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Auffälligkeiten
<i>skr-9</i> (SKp1 Related)	0,44 0,47 0,28	<ul style="list-style-type: none"> • Ubiquitin-Ligase • Reguliert Ubiquitin-vermittelte Protein-Degradation 	<ul style="list-style-type: none"> • Sterilität & reduzierte Reproduktion • Langsames Wachstum • Veränderte Morphologie
<i>asm-3</i> (Acid SphingoMyelinase)	0,52 0,35 0,27	<ul style="list-style-type: none"> • Saure Sphingomyelinase • Metallophosphoesterase 	<ul style="list-style-type: none"> • Verlängertes Leben • Paraquatresistenz • Veränderte Entwicklung
<i>lin-41</i> (abnormal cell LINeage)	0,74 0,80 0,55	<ul style="list-style-type: none"> • Ubiquitin-Ligase • Zellschicksal-Spezifizierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Sterilität • Geringe Größe
<i>hlh-2</i> (Helix Loop Helix)	0,68 0,73 0,54	<ul style="list-style-type: none"> • Transkriptionsfaktor • Zellschicksal-Spezifizierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Sterilität • Veränderte Entwicklung der Neuronen & Gonaden • Fehlende Apoptose

^a Veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Expr.=1,00), Farbschema: 1,25-2,50, 2,51-5,00, ≥ 5,01, 0,80-0,65, 0,64-0,50, ≤ 0,49

Tabelle 8: Variation der Genexpression in starker Abhängigkeit der eingesetzten TS-Konzentration

Gen	Veränderung der Genexpression ^a			Funktionen & Charakteristika des Gens und des codierten Proteins	RNAi Phänotyp / Phänotyp von Mutantenstämmen
	TS 100 µM	TS 200 µM	TS 300 µM		
<i>dct-5</i> (DAF-16/FOXO Controlled, germline Tumor affecting)	2,31	1,69	12,69	<ul style="list-style-type: none"> • Membranprotein • Transkriptionsfaktor 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Auffälligkeiten
<i>grl-21</i> (GRound-Like)	1,89	2,06	8,77	<ul style="list-style-type: none"> • Interzelluläre Signalweitergabe 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Auffälligkeiten
<i>H23N18.5</i>	2,00	1,22	7,83	<ul style="list-style-type: none"> • Phospholipase 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Auffälligkeiten
<i>H10E21.4</i>	1,49	1,20	6,75	<ul style="list-style-type: none"> • Calmodulin (Ca²⁺-bindendes Protein) 	<ul style="list-style-type: none"> • Veränderte Entwicklung
<i>C06E8.5</i>	1,21	1,30	5,68	<ul style="list-style-type: none"> • Lipid-bindendes Protein 	<ul style="list-style-type: none"> • Veränderte Entwicklung
<i>C10C5.3</i>	1,23	1,14	3,48	<ul style="list-style-type: none"> • Aminoacylase 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Auffälligkeiten
<i>C10C5.4</i>	0,94	0,82	2,59	<ul style="list-style-type: none"> • Metallopeptidase 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Auffälligkeiten
<i>F48G7.5</i>	1,11	0,96	4,30	<ul style="list-style-type: none"> • Sezernierendes Oberflächenprotein • Erhöhte Expression nach Atrazin-Exposition (Reichert & Menzel, 2005) 	<ul style="list-style-type: none"> • Sterilität • Veränderte embryonale & postembryonale Entwicklung
<i>pqn-60</i> (Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein)	0,63	0,67	1,03	<ul style="list-style-type: none"> • Prion-ähnliches Protein • Inhibition der Keimbahn-Apoptose 	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte Apoptose-Rate
<i>fkh-3</i> (ForKHead transcription factor)	0,89	0,87	0,29	<ul style="list-style-type: none"> • Transkriptionsfaktor 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Auffälligkeiten
<i>ceh-49</i> (C. Elegans Homeobox)	0,82	0,98	0,28	<ul style="list-style-type: none"> • Homeobox-Domäne • Regulation der Transkription 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Auffälligkeiten
<i>sip-1</i> (Stress Induced Protein)	0,77	0,88	0,59	<ul style="list-style-type: none"> • Gehört zur Familie der kleinen Hitzeschockproteine • Stress-induzierbar 	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte Pathogen-Anfälligkeit • Veränderte Entwicklung • Veränderte Lebensdauer
<i>catp-3</i> (Cation transporting ATPase)	0,69	0,53	1,91	<ul style="list-style-type: none"> • Na⁺/K⁺-ATPase • Erhöhte Expression nach Hitze- und UVC-Exposition (GuhaThakurta et al., 2002; Boyd et al., 2010) • Verringerte Expression nach Naphthoflavon- und Clofibrat-Exposition (Reichert & Menzel, 2005) 	<ul style="list-style-type: none"> • Veränderte Eiablage

^a Veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Expr.=1,00), Farbschema: **1,25-2,50**, **2,51-5,00**, **≥ 5,01**, **0,80-0,65**, **0,64-0,50**, **≤ 0,49**

Tabelle 9: Variation der Genexpression durch TS bei Lebensdauer- und Stress-assoziierten Genen

Gen	Veränderung der Genexpression ^a			Funktionen & Charakteristika des Gens und des codierten Proteins	RNAi Phänotyp / Phänotyp von Mutantenstämmen
	TS 100 μM	TS 200 μM	TS 300 μM		
<i>age-1</i> (AGEing alteration)	0,86	1,08	0,60	<ul style="list-style-type: none"> Gehört zur Phosphoinositid 3-kinase (PI3K) Familie Negative Regulation von DAF-16 im IIS Regulation der Lebensdauer, Dauerformation, Stressresistenz, Fertilität und embryonalen Entwicklung 	<ul style="list-style-type: none"> Verlängertes Leben Paraquat- & Cadmium-resistenz Dauer-konstitutiv
<i>akt-2</i> (AKT kinase family)	1,12	1,14	1,05	<ul style="list-style-type: none"> Homolog zur Serin/Threonin-Kinase AKT/PKB Negative Regulation von DAF-16 im IIS Regulation des Dauerstadiums und der Lebensdauer 	<ul style="list-style-type: none"> Verlängertes Leben Defekte Ei-Ablage Dauer-konstitutiv Erhöhter Fettgehalt
<i>daf-2</i> (abnormal DAuer I-Formation)	0,96	0,97	0,98	<ul style="list-style-type: none"> Rezeptor-Tyrosin-Kinase Ortholog zum Insulin/IGF-Rezeptor Negative Regulation von DAF-16 im IIS und von SKN-1 Regulation der Dauerformation, Lebensdauer, Reproduktion, Stressantwort, Fettspeicherung und der embryonalen und larvalen Entwicklung 	<ul style="list-style-type: none"> Verlängertes Leben Stressresistenz Dauer-konstitutiv Langsames Wachstum Verringerte Reproduktion Erhöhter Fettgehalt
<i>daf-12</i> (abnormal DAuer I-Formation)	0,98	1,00	0,99	<ul style="list-style-type: none"> Mitglied der Steroid-Hormon-Rezeptor Familie Homolog zum Vitamin D-Rezeptor Beeinflusst Dauerformation unterhalb des IIS- und TGF-Weges Beeinflusst Langlebigkeit zusammen mit DAF-16 	<ul style="list-style-type: none"> Kürzere Lebensdauer Dauer-defekt Langsames Wachstum Verminderter Fettgehalt Verringerte Reproduktion
<i>daf-16</i> (abnormal DAuer I-Formation)	0,81	0,96	0,69	<ul style="list-style-type: none"> Transkriptionsfaktor der HNF-3/ Forkhead-Familie Interagiert mit DAF-12 Schlüsselement des IIS Regulation der Dauerformation und Stressantwort 	<ul style="list-style-type: none"> Kürzere Lebensdauer Dauer-defekt Defekte Eiablage
<i>eat-2</i> (EATing)	0,99	1,00	0,99	<ul style="list-style-type: none"> Untereinheit eines Liganden-gesteuerten Ionen-Kanals Regulation des pharyngealen Pumpens Beeinflussung der Nahrungsaufnahme 	<ul style="list-style-type: none"> Verringerte Pharynx-Pumpfrequenz Längere Lebensdauer Verminderter Fettgehalt

Fortsetzung Tabelle 9

<i>jnk-1</i> (Jun N-terminal Kinase)	1,28	1,26	1,57	<ul style="list-style-type: none"> Serin/Threonin-Kinase Gehört zur Gruppe der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) Regulation der Fortbewegung, Lebensdauer und Stressantwort Regulation der DAF-16-Translokation in den Nukleus 	<ul style="list-style-type: none"> Erhöhte Pathogenresistenz Veränderte Morphologie Hypersensitiv gegenüber Aldicarb
<i>mev-1</i> (abnormal MEthyl Viologen sensitivity)	1,03	1,09	1,03	<ul style="list-style-type: none"> Ortholog zur Succinat-Dehydrogenase-Komplex- Untereinheit Vermehrte Akkumulation von endogenem ROS (Ishii et al. 1998) 	<ul style="list-style-type: none"> Langsames Wachstum Paraquat-hypersensitiv Verringerte Reproduktion Kurze Lebensdauer
<i>nhr-8</i> (Nuclear Hormone Receptor family)	1,27	1,21	1,77	<ul style="list-style-type: none"> Gehört zur nuklearen Hormon-Rezeptor-Familie Beteiligung am Xenobiotika-Abwehrsystem (Lindblom et al., 2001) 	<ul style="list-style-type: none"> Hypersensitiv gegenüber Colchicin & Chloroquin Langsames Wachstum Veränderte Morphologie & Körpergröße
<i>ost-1</i> (Osmotic Stress Resistant)	0,98	0,99	0,99	<ul style="list-style-type: none"> Reguliert Überleben in hyperosmotischer Umgebung (Solomon et al. 2004) 	<ul style="list-style-type: none"> Langsames Wachstum Veränderte Fortbewegung Veränderte Antwort auf osmotischen Stress
<i>sek-1</i> (SAPK/ERK kinase)	0,76	0,86	0,86	<ul style="list-style-type: none"> MAPK-Kinase-Aktivität Regulation der zellulären Stressantwort, der Pathogenabwehr und der angeborenen Immunantwort 	<ul style="list-style-type: none"> Stress-sensitiv Defekte Eiablage Hohe Pathogen-Anfälligkeit
<i>sir-2.1</i> (yeast SIR related; Silent Information Regulator)	1,12	1,13	0,99	<ul style="list-style-type: none"> NAD-abhängige Histon-Deacetylase Transkriptions-Inhibition durch Veränderung des Chromatins Genetische Vermehrung führt zu Lebensverlängerung 	<ul style="list-style-type: none"> Kürzere Lebensdauer
<i>skin-1</i> (SKiNhead)	0,93	1,19	0,68	<ul style="list-style-type: none"> Transkriptionsfaktor Regulation der oxidativen Stressantwort im p38-MAPK-Signalweg Regulation der Lebensdauer parallel zu DAF-16 im IIS Stress-induzierbare Expression 	<ul style="list-style-type: none"> Verringertes Wachstum Verringerte Reproduktion Hypersensitiv gegenüber oxidativen Stress
<i>unc-43</i> (UNCordinated)	0,95	0,98	1,00	<ul style="list-style-type: none"> CaMKII (Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II) Beteiligung an verschiedenen Prozessen wie neuronale Zell-Schicksal-Spezififizierung, Fortbewegung und Eiablage 	<ul style="list-style-type: none"> Veränderte Fortbewegung Sterilität Hypersensitiv gegenüber Aldicarb & Pathogenen

^a Veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Expr.=1,00), Farbschema: 1,25-2,50, 2,51-5,00 ≥ 5,01, 0,80-0,65, 0,64-0,50, ≤ 0,49

Tabelle 8 stellt einzelne Gene dar, deren Genexpressionen durch die lebensverlängernden TS-Konzentrationen (100 μ M und 200 μ M) anders reguliert wurden, als durch die schädigende Konzentration (300 μ M). So wurde die Transkription der Gene *dct-5*, *grl-21*, *H23N18.5*, *H10E21.4*, *C06E8.5*, *C10C5.3*, *C10C5.4* und *F48G7.5* durch 100 μ M und 200 μ M TS kaum oder gar nicht induziert, wohingegen 300 μ M TS einen starken Einfluss ausübte. Ebenfalls konnten die an dem Transkriptionsprozess beteiligten Gene *fkh-3* und *ceh-49* nur durch 300 μ M TS beeinflusst werden. In diesem Fall wurde die Genexpression aber stark herunterreguliert. Ein ähnlicher, abgeschwächter Effekt konnte auch bei dem Stress-induzierbaren Gen *sip-1* beobachtet werden. Besonders interessant sind jedoch die Genexpressionen von *pqn-60* und *catp-3*. Eine Repression unter Verwendung von 100 und 200 μ M TS bei einer unveränderten Expression unter Verwendung von 300 μ M TS wurde bei *pqn-60* festgestellt. Dies ist erstaunlich, da eine kontinuierliche Verstärkung des beobachteten Effektes durch Erhöhung der Konzentration zu erwarten gewesen wäre. Noch auffälliger ist jedoch das Transkriptionsmuster von dem ATPase-kodierenden Gen *catp-3*, welches eine Repression der Genexpression bei 100 und 200 μ M TS aufwies, und eine Induktion bei 300 μ M.

Schließlich wurden in **Tabelle 9** prominente Gene mit bekanntem Einfluss auf Lebensdauer und Stresstoleranz aufgezeigt. Die Kernelemente des IIS, *daf-2*, *akt-2*, *age-1* und *daf-16*, wurden kaum durch Tanninsäure reguliert. Nur 300 μ M konnte eine Repression bei *age-1* und *daf-16* bewirken. DAF-16 und AGE-1 regulieren die Lebensdauer jedoch konträr, so dass eine Interpretation dieser Repressionen schwierig ist. Auch das Transkriptionsfaktor-kodierende Gen *skn-1* wurde durch 300 μ M TS reprimiert, was laut RNAi-Phänotyp zu einer Stress-Sensitivität führen kann. *Sek-1* wurde durch 100 μ M TS reprimiert, wobei eine Tendenz auch in den anderen beiden Konzentrationen zu erkennen ist. Leicht hochreguliert wurden indes *jnk-1* und *nhr-8*, die anderen Gene konnten nicht beeinflusst werden.

Einige Gene wurden anhand der Microarray-Ergebnisse ausgewählt, um deren Expressionsmuster an verschiedenen Tagen unter TS-Einfluss zu untersuchen. Dazu wurden die lebensverlängernden Konzentrationen 100 und 200 μ M zur Exposition selektiert und die Genexpression am 3., 6. und 10. Adult-Tag mittels qRT-PCR ermittelt. Die Gene *cav-1*, *pup-2*, *glp-1* und *numr-1* wurden aufgrund der starken Regulation bei der Microarray-Analyse ausgewählt. Ferner erschien *sek-1* interessant, da es insbesondere unter 100 μ M TS reprimiert worden ist und in der Stressabwehr involviert ist. *Msp-64* wurde als Repräsentant für alle hochregulierten *msh*-Gene gewählt. Schließlich wurden noch zwei Gene selektiert, die in dem durchgeführten Array nicht aufgefallen sind. Bei einer ähnlichen Microarray-Analyse des Polyphenols Quercetin konnte eine starke Repression von *lys-10* (LYSozym) und eine starke Induktion von *sod-5* (SuperOxid-Dismutase) festgestellt werden (unveröffentlichte Daten). SOD-5 ist beteiligt an der Abwehr von Sauerstoff-Radikalen (Doonan et al., 2008a) und LYS-10 beeinflusst maßgeblich die Lebensdauer

(Samuelson et al., 2007). Um zu überprüfen, ob TS eventuell zu einem späteren Zeitpunkt Einfluss auf deren Genexpression nehmen würde, wurden diese beiden Gene auch mittels qRT-PCR analysiert.

Tabelle 10: Mittelwerte der qRT-PCR-Analyse nach TS-Exposition

Konzentration	Gen	Tag 1	Tag 3		Tag 6		Tag 10	
		Expr. Microarray	Expr.	± SEM	Expr.	± SEM	Expr.	± SEM
100 µM TS	<i>sek-1</i>	0,76	0,82	± 0,10	0,89	± 0,45	0,96	± 0,15
	<i>lys-10</i>	1,00	1,36	± 0,65	0,26**	± 0,10	0,29**	± 0,10
	<i>cav-1</i>	0,47	1,92	± 1,02	2,23	± 1,68	0,54**	± 0,08
	<i>pup-2</i>	0,59	0,55**	± 0,08	1,03	± 0,24	0,89	± 0,13
	<i>glp-1</i>	0,64	0,59*	± 0,08	0,91	± 0,38	1,10	± 0,16
	<i>numr-1</i>	75,71	35,09**	± 2,96	40,11	± 19,27	12,17**	± 1,60
	<i>sod-5</i>	0,96	0,65	± 0,22	0,52	± 0,06	0,78	± 0,24
	<i>msp-64</i>	1,69	0,81	± 0,23	1,59	± 1,47	0,57*	± 0,15
200 µM TS	<i>sek-1</i>	0,86	0,47	± 0,33	0,85	± 0,20	0,57**	± 0,07
	<i>lys-10</i>	0,97	0,68	± 0,15	0,16**	± 0,03	0,14**	± 0,08
	<i>cav-1</i>	0,47	1,19	± 0,51	0,73	± 0,16	0,57	± 0,29
	<i>pup-2</i>	0,68	0,30*	± 0,16	0,90	± 0,35	0,94	± 0,27
	<i>glp-1</i>	0,74	0,27*	± 0,26	1,28	± 0,57	0,76*	± 0,08
	<i>numr-1</i>	95,84	39,84*	± 12,67	32,89**	± 4,41	12,66*	± 4,30
	<i>sod-5</i>	0,96	0,73	± 0,53	1,11	± 0,10	0,67	± 0,18
	<i>msp-64</i>	1,67	0,99	± 0,60	1,05	± 0,28	0,32*	± 0,13

Abkürzungen: Expr.= Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle; SEM=Standardfehler des Mittelwertes. Unterschiede zur Kontrolle gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**). Farbschema: 1,25-2,50, 2,51-5,00, $\geq 5,01$, 0,80-0,65, 0,64-0,50, $\leq 0,49$

Tabelle 10 fasst die qRT-PCR Ergebnisse aus je drei unabhängigen Experimenten zusammen. Zu Vergleichszwecken wurden die Ergebnisse der Microarray-Analyse, welche am 1. Adult-Tag durchgeführt wurde, in die Tabelle eingebunden. Die durchgeführte statistische Analyse ist nur begrenzt aussagekräftig, da nur drei Daten je Gen und Konzentration vorlagen.

Die Genexpression von *sek-1* zeigte an allen Tagen und beiden Konzentrationen eine Tendenz zur Abschaltung, wobei nur 200 µM eine mindestens 1,25-fache Repression in der qRT-PCR-Analyse aufwies. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, die mittels Microarray gemacht wurden. Im Gegensatz dazu überraschten die Ergebnisse von *lys-10* und *sod-5*, die sich im Microarray-Experiment zunächst als unauffällig erwiesen. Die qRT-PCR-Analyse enthüllte jedoch, dass *lys-10* insbesondere am 6. und 10. Adult-Tag stark herunterreguliert wurde und dass 100 µM an allen drei Tagen und 200 µM am 3. und 10. Adult-Tag eine Repression der *sod-5* Genexpression bewirkte. Ebenso unerwartet ist die Repression von *msp-64* am 10. Adult-Tag, denn

am 1. Adult-Tag zeigte die Microarray-Analyse noch eine Induktion von vielen *msh*-Genen, darunter auch *msh-64*. Die erstaunliche Induktion von *numr-1* am 1. Adult-Tag konnte auch durch die qRT-PCR festgestellt werden, wobei sich der Unterschied zur Kontrolle mit zunehmendem Alter verringerte. Die Gene *pup-2* und *glp-1*, welche eine Repression durch TS im Microarray zeigten, wurden auch am 3. Adult-Tag durch 100 und 200 μ M TS herunterreguliert. 100 μ M TS hatte jedoch im älter werdenden Tier keinen Einfluss mehr auf die Genexpression dieser beiden Gene; dies trifft auch auf *pup-2* nach Exposition von 200 μ M zu. Die Zunahme der Expression von *glp-1* am 6. Adult-Tag unter Einfluss von 200 μ M TS ist aufgrund des hohen Fehlerwertes von 0,57 (SEM) zweifelhaft, die Repression am 10. Tag scheint mehr Aussagekraft zu besitzen. Ähnliche Probleme ergeben sich bei der Betrachtung des Gens *cav-1*, welches im Microarray eine Repression aufwies. Der SEM ist am 3. und 6. Adult-Tag unter Verwendung von 100 μ M TS als auch am 3. Adult-Tag unter Verwendung von 200 μ M TS sehr hoch, so dass diese Werte als unzuverlässig eingestuft werden können. Die anderen stabileren Werte weisen auf eine Repression des Gens durch beide Konzentrationen hin.

3.8 Einfluss von Tanninen auf verschiedene Mutantenstämme

Diverse Gene und Signalwege, die im Prozess der Stressabwehr, Alterung und Determination der Lebensdauer involviert sind, sind bereits in *C. elegans* bekannt. Um zu ermitteln, ob einige dieser prominenten Gene an der lebensverlängernden und stressprotektiven Kapazität der Tannine beteiligt sind, wurden 14 Mutantenstämme selektiert. Die ausgeschalteten Gene der Mutantenstämme entsprechen denen in **Tabelle 9**. Bewirkt das Ausschalten eines Gens den Verlust oder eine Abschwächung des positiven Effektes eines Tannins, so könnte dieses Gen eine entscheidende Rolle im Wirkmechanismus spielen. Zwei Mutantenstämmen kommen dabei besondere Bedeutung zu: i) *mev-1*-Mutanten dienen zur Ermittlung der Relevanz der antioxidativen Kapazität der Tannine. Sie leiden an erhöhter ROS-Produktion und einer damit verbundenen Lebensverkürzung. Es ist anzunehmen, dass eine starke antioxidativ-wirkende Substanz einen positiven Effekt ausübt. ii) *eat-2*-Mutanten werden eingesetzt, um einen potentiellen CR-auslösenden Effekt bei einem Tannin festzustellen. Diese Mutanten sind aufgrund verringerter Nahrungszufuhr stetig dem CR-Effekt ausgesetzt und leben daher länger. Bewirkt ein Tannin eine Lebensverlängerung durch Auslösen eines CR-Effektes, so sollte die Lebensverlängerung in dieser Mutante nicht nachzuweisen sein. Aus der Microarray-Studie wurden zusätzlich zwei weitere Gene ausgewählt: *numr-1*, aufgrund seiner starken Induktion, und *cav-1*, aufgrund der ermittelten Repression. Die sehr zeitintensive Analyse der Tanninwirkung auf Mutanten wurde nur mit Catechin und Tanninsäure vollständig durchgeführt. Ellagsäure und Gallussäure wurden nur mit *mev-1*- und *eat-2*-Mutanten hinsichtlich der Lebensdauer getestet, da angenommen werden kann, dass die lebensverlängernde Eigenschaft beider

Substanzen auf antimikrobiellen Effekten beruht. Bei Verwendung dieser Substanzen würde dann vermutlich hauptsächlich getestet werden, ob die Mutante positiv auf die Reduktion der *E. coli*-Metabolite reagiert, und nicht auf die Substanz selbst.

Zunächst wurde die Lebensdauer der Mutantenstämme in An- und Abwesenheit des Tannins beobachtet. *Sek-1*-Mutanten weisen eine hohe Rate an „internal hatch“ auf. Diese Tiere wurden bei 15°C getestet, da geringere Temperaturen diesen störenden Effekt zu minimieren scheinen. *Daf-2*-Mutanten sind Temperatur-sensitiv und wurden bei 23°C getestet, um den langlebigen Phänotyp zu erhalten. *Age-1*-Mutanten wurde aus technischen Gründen unter Catechin-Einfluss bei 23°C und unter Tanninsäure-Einfluss bei 20°C getestet. Die verbleibenden Stämme wurden ebenfalls bei 20°C getestet.

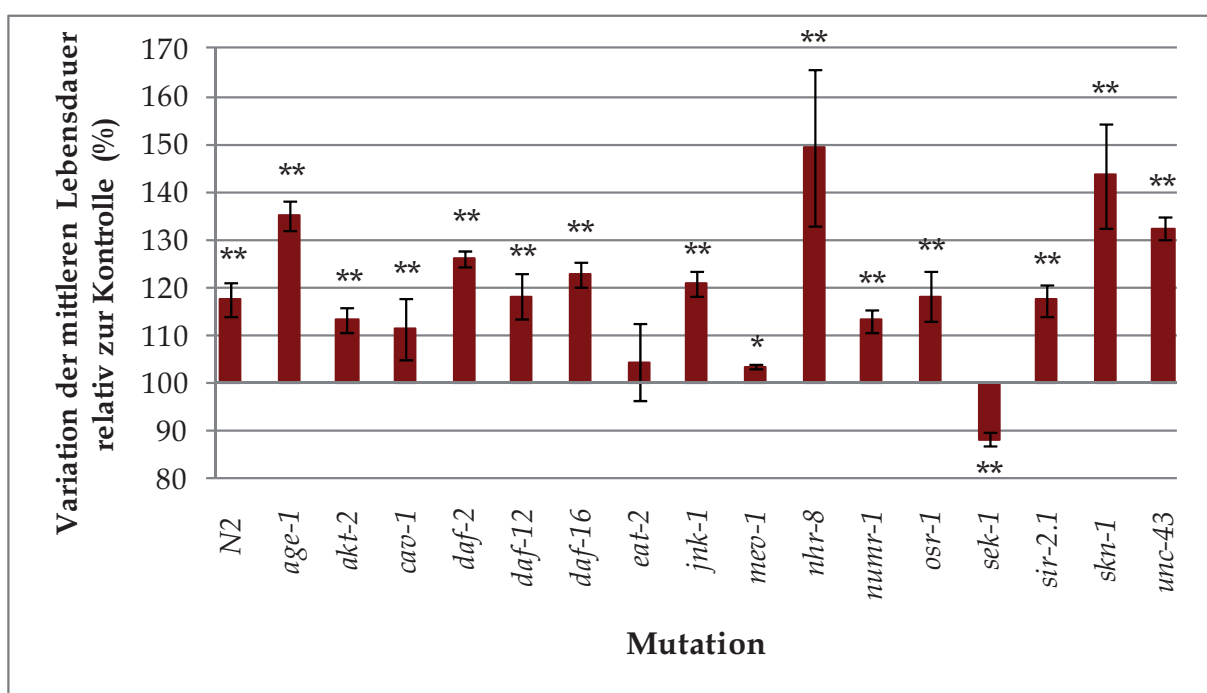


Abb. 29: Variation der mittleren Lebensdauer durch 100 μ M Tanninsäure

Dargestellt ist die durchschnittliche Variation der mittleren Lebensdauer bei Behandlung mit 100 μ M TS in 16 Mutantenstämmen relativ zum jeweils unbehandelten Mutanten-stamm. Zu Vergleichszwecken ist die Variation der mittleren Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden bei 20°C ebenso dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und Unterschiede zur Kontrolle gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

Abbildung 29 illustriert die Unterschiede der mittleren Lebensdauer von 16 TS-behandelten und unbehandelten Mutantenstämmen. Die mittlere und mediane Lebensdauer der einzelnen Versuche als auch der jeweilige Mittelwert befinden sich im Anhang (Tab. A7 & A8). Die genauen Bezeichnungen der Mutantenstämme als auch der Allele können Kapitel 2.1 entnommen werden. Die stärksten positiven Effekte wurden mit den Mutantenstämmen *age-1*, *nhr-8*, *skn-1* und *unc-43* erzielt. Die Behandlung mit 100 μ M TS erhöhte die Lebensdauer um mehr als 30%. Die TS-Exposition führte weiterhin zu einem Anstieg der mittleren Lebensdauer (zwischen 11% und 26%) in den Mutantenstämmen *akt-2*, *cav-1*, *daf-2*, *daf-12*, *daf-16*, *jnk-1*, *numr-*

1, *osr-1* und *sir-2.1*. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen des Wildtyps bei 20°C. Keine signifikante Lebensverlängerung konnte jedoch in *eat-2*-Mutanten erreicht werden, wobei die einzelnen Versuche sehr heterogen ausfielen. Dies könnte die Konsequenz des Verhaltens dieses Mutantenstammes sein, da die Tiere in großer Anzahl die Agarplatte verließen (Daten nicht aufgeführt). Die Aussagekraft der einzelnen Versuche könnte so stark eingeschränkt sein. *Mev-1*-Mutanten profitieren zwar leicht im Mittel, jedoch konnte in keinem der drei Einzelversuche eine Signifikanz festgestellt werden. Eine schwach positive Wirkung ist aber auch in den einzelnen Versuchen zu erkennen. *Sek-1*-Mutanten sind die einzigen Tiere, die negative Auswirkungen aufgrund der TS-Exposition zeigten. Vier unabhängig durchgeführte Lebensdauertests wiesen eine bemerkenswerte Abnahme der medianen und mittleren Lebensdauer auf. Zusätzlich wurden Lebensdauertests der *sek-1*-Mutanten mit 25 μ M und 50 μ M TS durchgeführt. Dadurch konnte ermittelt werden, ob eine erhöhte Sensitivität der Mutanten vorliegt und eine Verringerung der TS-Konzentration zu einem positiven Effekt führen kann. Jedoch konnte keines der Expositions-Szenarien zu einer signifikanten Lebensverlängerung führen (Anhang Tab A7 & A8).

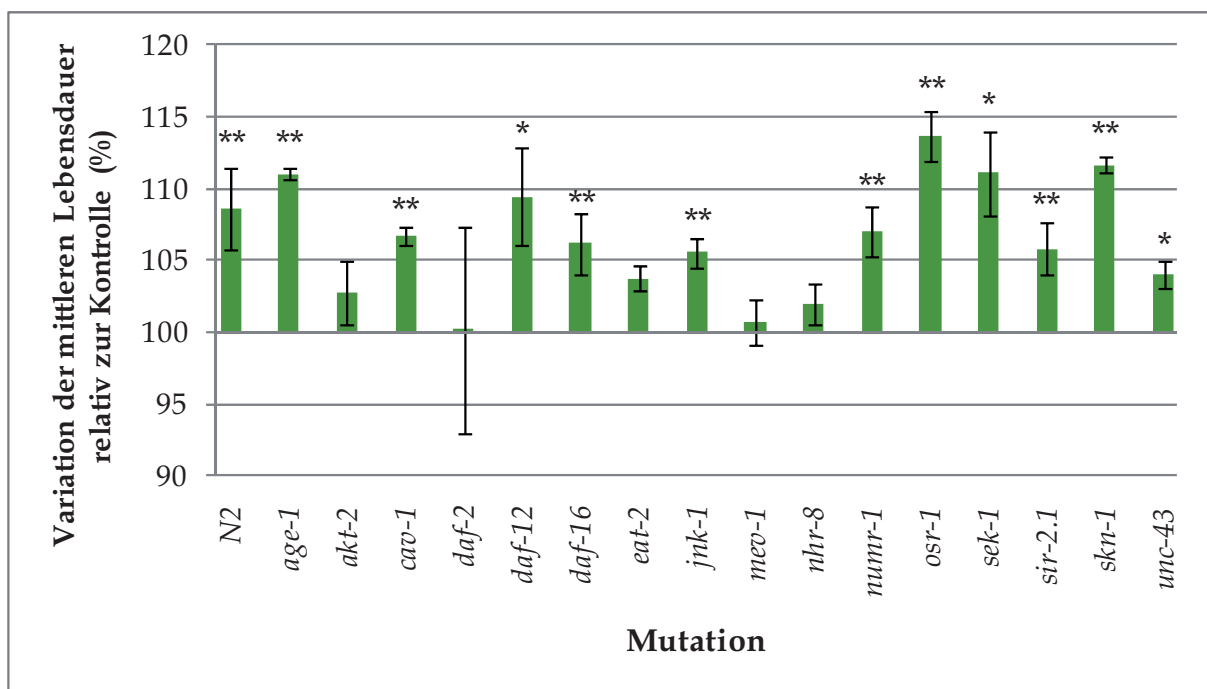


Abb. 30: Variation der mittleren Lebensdauer durch 200 μ M Catechin

Dargestellt ist die durchschnittliche Variation der mittleren Lebensdauer bei Behandlung mit 200 μ M CT in 16 Mutantenstämmen relativ zum jeweils unbehandelten Mutantenstamm. Zu Vergleichszwecken ist die Variation der mittleren Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden bei 20°C ebenso dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und Unterschiede zur Kontrolle gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

Abbildung 30 stellt die Veränderung der Lebensdauer in den Mutantenstämmen durch 200 μ M CT dar. Die Ergebnisse der Einzelversuche als auch die Mittelwerte befinden sich im Anhang (Tab. A9 & A10). Auch hier ist leicht ersichtlich, wie bei

vielen der dargestellten Wildtyp-Studien, dass CT insgesamt einen schwächeren Einfluss ausübt als TS. Signifikante Lebensverlängerungen konnten in *age-1-*, *cav-1-*, *daf-12-*, *daf-16-*, *jnk-1-*, *numr-1-*, *osr-1-*, *sek-1-*, *sir-2.1-*, *skn-1-* und *unc-43-* Mutanten ermittelt werden. Im Gegensatz dazu konnten *akt-2-*, *daf-2-*, *eat-2-*, *mev-1-* und *nhr-8-* Mutanten nicht signifikant von einer CT-Behandlung profitieren. Bei *akt-2* und *eat-2* ist jedoch eine leicht lebensverlängernde Tendenz ersichtlich. Die Einzelergebnisse der Lebensdauer in *daf-2*-Mutanten sind sehr heterogen, so dass die Interpretation dieses Stammes nur eingeschränkt möglich ist.

50 μ M Ellagsäure und 300 μ M Gallussäure wurden in zwei Mutantenstämmen auf lebensverlängernde Eigenschaften getestet. *Mev-1*-Mutanten lebten durch die Behandlung beider Tannine signifikant länger (**Abb. 31**). Im Gegensatz dazu konnte in *eat-2*-Mutanten keine signifikante Veränderung der Lebensdauer durch GS oder ES beobachtet werden (**Abb. 32**). Jedoch ist eine leicht positive Tendenz in GS-behandelten und eine leicht negative Tendenz in ES-behandelten Tieren zu erkennen, welche sich insbesondere im Median bemerkbar macht (Anhang **Tab. A11 & A12**).

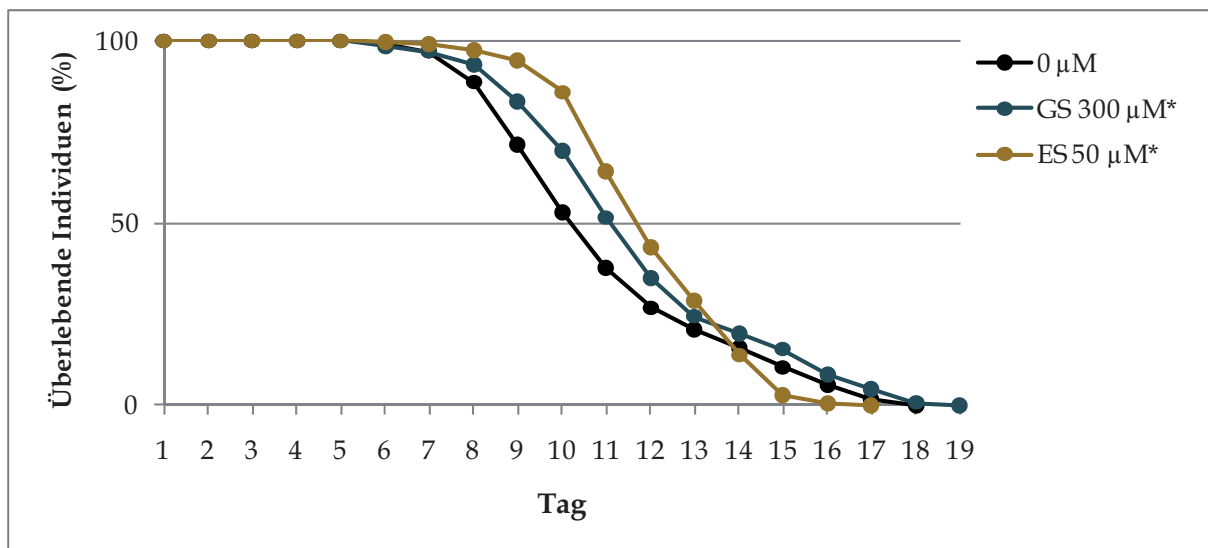


Abb. 31: Lebensdauer der *mev-1*-Mutante unter GS- und ES-Einfluss

Dargestellt sind die Überlebenskurven von GS- und ES-behandelten und unbehandelten *mev-1*-Mutanten. Die Kurven repräsentieren die Mittelwerte der zwei Einzelversuche bei 20°C. Unterschiede zur Kontrolle gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**). Der erste Tag bezieht sich auf den 1. Adult-Tag.

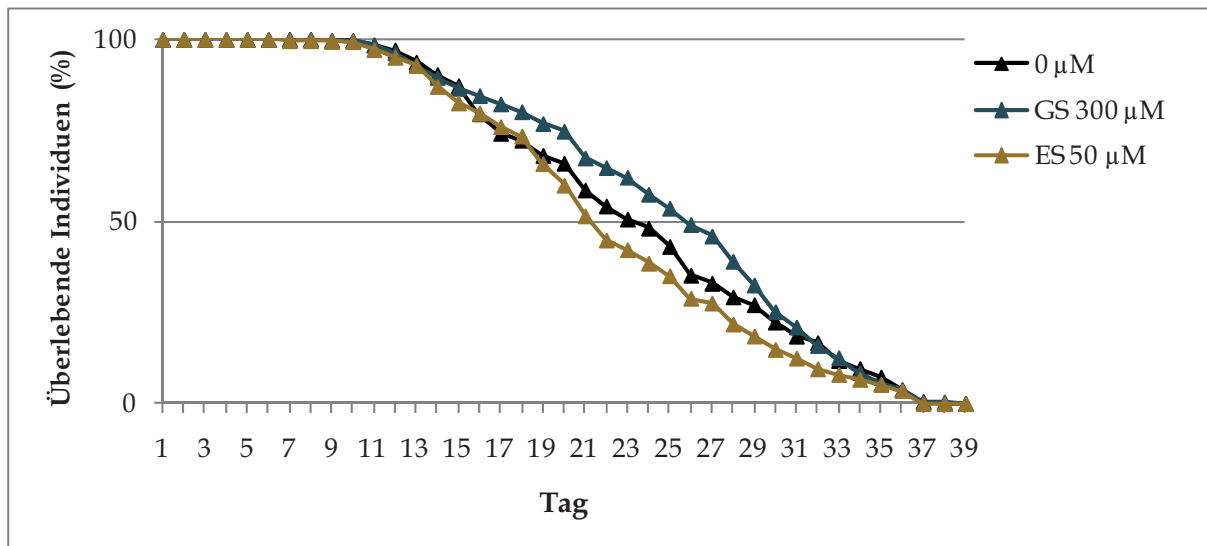


Abb. 32: Lebensdauer der *eat-2*-Mutante unter GS- und ES-Einfluss

Dargestellt sind die Überlebenskurven von GS- und ES-behandelten und unbehandelten *eat-2*-Mutanten. Die Kurven repräsentieren die Mittelwerte der zwei Einzelversuche bei 20°C. Unterschiede zur Kontrolle gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**). Der erste Tag bezieht sich auf den 1. Adult-Tag.

Um zu ermitteln, ob die Ursachen der Stressresistenz und der Lebensverlängerung deckungsgleich sind, wurden die Mutanten auch hinsichtlich ihrer Stresstoleranz in TS- und CT-behandelten Tieren untersucht. Da Tanninsäure gegenüber oxidativem Stress nur schwache und unbeständige Auswirkungen zeigte, wurde der Thermotoleranztest für die Untersuchung der Mutantenstämme ausgewählt. Hitzegestresste Wildtyp-Tiere profitierten von 100 µM TS (**Abb. 7**), so dass diese Konzentration auch für diesen Test gewählt wurde. In **Abbildung 33** werden die gemittelten Ergebnisse zusammengefasst und die relative Veränderung der Hitzetoleranz durch TS dargestellt. Weiterführende Angaben zur Dauer der Stressexposition, Versuchsanzahl und Anzahl der beobachteten Tiere sind **Tabelle A13** (Anhang) zu entnehmen. Konsistent mit der Lebensdauerstudie profitierten auch beim Thermotoleranztest *mev-1*- und *sek-1*-Mutanten nicht von einer TS-Behandlung. Die starke toxische Wirkung von TS gegenüber *sek-1*-Tieren blieb jedoch aus. Überraschenderweise konnte die Thermotoleranz von *daf-12*- und *daf-16*-Mutanten auch nicht durch eine TS-Exposition verbessert werden, wohingegen eine signifikante Lebensverlängerung in beiden Fällen durchaus erzielt werden konnte.

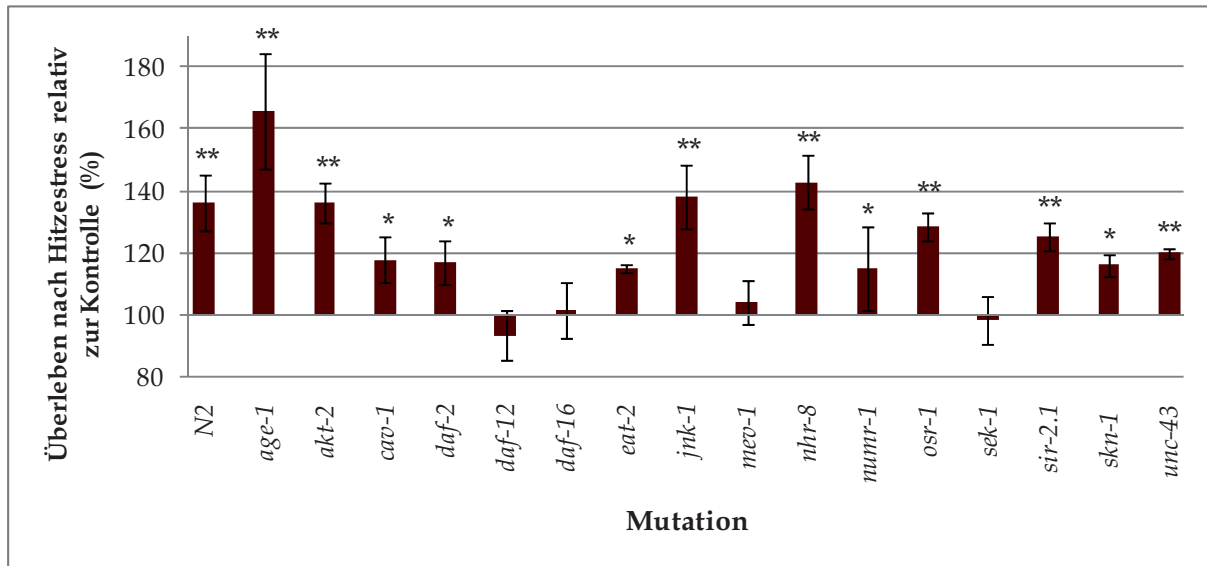


Abb. 33: Einfluss von Tanninsäure auf die thermische Stressresistenz verschiedener Mutantenstämme
Dargestellt sind die Mittelwerte von Thermotoleranztests mit 16 verschiedenen Mutantenstämmen als auch dem Wildtyp zu Vergleichszwecken. Die Balken stellen die Variation der Toleranz gegenüber Hitzestress durch 100 μ M TS im Vergleich zur jeweiligen, unbehandelten Kontrolle (100%) dar. *Sek-1*-Mutanten wurden bei 15°C und *daf-2*-Mutanten bei 23°C gehalten. Die übrigen Stämme wurden bei 20°C kultiviert. Am 6. Adult-Tag wurden die Tiere 6-10 Stunden 35°C ausgesetzt und anschließend tote und lebende Tiere ausgezählt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes und Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle (0 μ M) gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

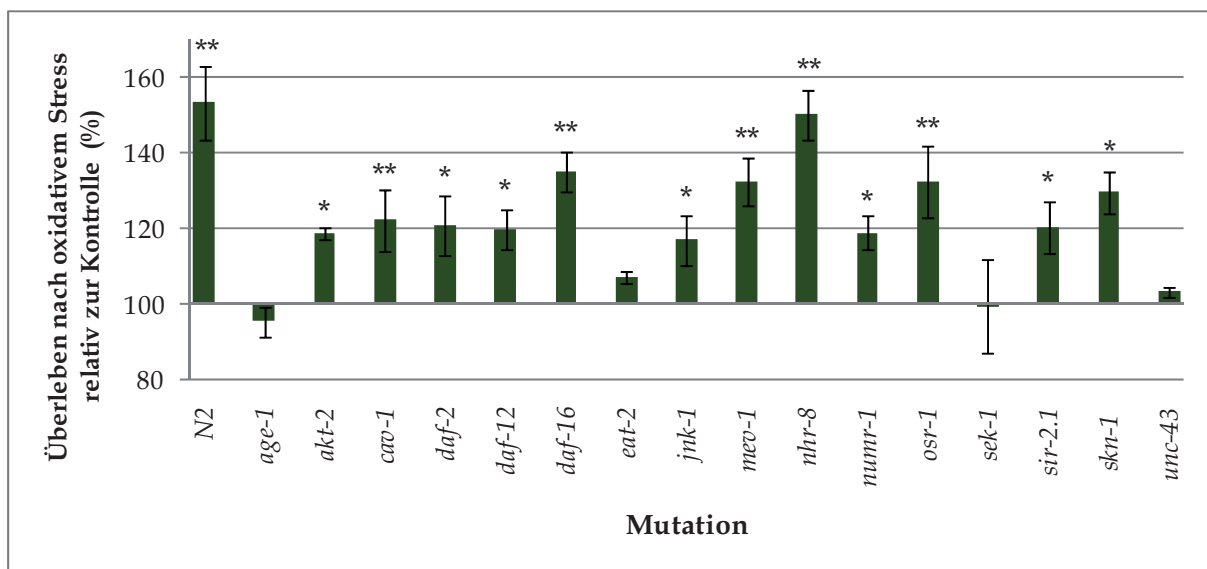


Abb. 34: Einfluss von Catechin auf die oxidative Stressresistenz verschiedener Mutantenstämme
Dargestellt sind die Mittelwerte von oxidativen Stresstests mit 16 verschiedenen Mutantenstämmen als auch dem Wildtyp zu Vergleichszwecken. Die Balken stellen die Variation der Toleranz gegenüber oxidativen Stress durch 300 μ M CT im Vergleich zur jeweiligen, unbehandelten Kontrolle (100%) dar. *Sek-1*-Mutanten wurden bei 15°C und *daf-2*-Mutanten bei 23°C gehalten. Die übrigen Stämme wurden bei 20°C kultiviert. Am 6. Adult-Tag wurden die Tiere 6-10 Stunden 0,8 mM H_2O_2 ausgesetzt und anschließend tote und lebende Tiere ausgezählt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes und Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle (0 μ M) gelten als signifikant mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**).

Da Catechin nur eine mäßig positive Auswirkung auf die thermische Stressresistenz in Wildtypen aufwies, die oxidative Stressresistenz aber stark positiv beeinflusst worden ist, wurde letzterer Test auch zur Analyse der 16 Mutantenstämme verwendet. Im Gegensatz zu den Lebensdauertests wurde hier eine erhöhte Konzentration von 300 μ M CT verwendet, da der positive Effekt dieser Dosis eine deutlich bessere Kontinuität in den Einzelversuchen aufwies (**Abb. 10**). In **Abbildung 34** werden die Ergebnisse in der Übersicht dargestellt. Nähere Informationen sind der **Tabelle A14** im Anhang zu entnehmen.

Die Stressresistenzen der Mutantenstämme, die im Lebensdauertest nicht von einer CT-Exposition profitierten, *akt-2*, *daf-2*, *mev-1* und *nhr-8*, wurden durch 300 μ M CT signifikant erhöht. *nhr-8*-Mutanten erwiesen sich dabei als besonders empfänglich für die protektive Wirkung. Nur bei *eat-2* ist eine nicht signifikante, aber leicht positive Tendenz in beiden Tests erkennbar. Zudem wiesen *age-1*-, *sek-1*- und *unc-43*-Mutanten keine verbesserte Toleranz gegenüber oxidativem Stress nach CT-Behandlung auf. Diese Stämme erzielten jedoch eine gute Ansprechrate auf CT im Lebensdauertest.

3.9 Keine Translokation von DAF-16

DAF-16 ist ein Schlüsselement bei der Determinierung der Lebensdauer, der Stressabwehr und in vielen Prozessen, unter anderem über den IIS, beteiligt. Zusätzlich zur Analyse der Genexpression und der Sensitivität von *daf-16*-Mutanten gegenüber Tanninen soll daher abschließend ermittelt werden, ob die Aktivität von DAF-16 durch Tannine beeinflusst wird. Die Aktivierung von DAF-16 erfolgt weniger über die Genexpression, denn über Aktivierung der Translokation in den Nukleus und über Bindung von Co-Faktoren im Nukleus (Lin et al., 2001). Daher ist die Ermittlung der Translokation eine sinnvolle Ergänzung zur Genexpressionsanalyse. Zudem wurde festgestellt, dass das Polyphenol Quercetin eine Translokation von DAF-16 induziert (Kampkötter et al., 2007b, 2008), obwohl eine Lebensverlängerung nicht DAF-16 bedarf (Saul et al., 2008). Dies ist auch für die Polyphenole in dieser Arbeit denkbar und sollte daher untersucht werden.

Abbildung 35A beweist eindrucksvoll, wie stark DAF-16 auf Hitzestress reagiert. Die punktförmige Fluoreszenz zeigt an, dass sich DAF-16, zusammen mit dem grün fluoreszierenden Reporter GFP, im Zellkern befindet. Ein ähnliches Bild ergibt sich nach Hungerstress (Daten nicht gezeigt). Wurden die Tiere jedoch keinem Hitze- oder Hunger-Stress ausgesetzt, so konnte auch keine Translokation detektiert werden. Die Tiere wurden hierbei unbehandelt als auch Tannin-behandelt unter dem Fluoreszenzmikroskop an mehreren Tagen beobachtet (**Abb. 35B**). Die effektivsten Konzentrationen (bezogen auf die mittlere Lebensdauer) der Tannine wurden für diese Untersuchung ausgewählt. Die Tiere wurden zwischen dem 1. und 6. Adult-Tag zweimal täglich beobachtet. Es wurde hierbei bei keiner Konzentration eine

Translokation festgestellt. Auch der intermediäre Typ, welcher sich durch teilweise Translokation auszeichnet (Kampkötter et al., 2008), konnte nicht erfasst werden.

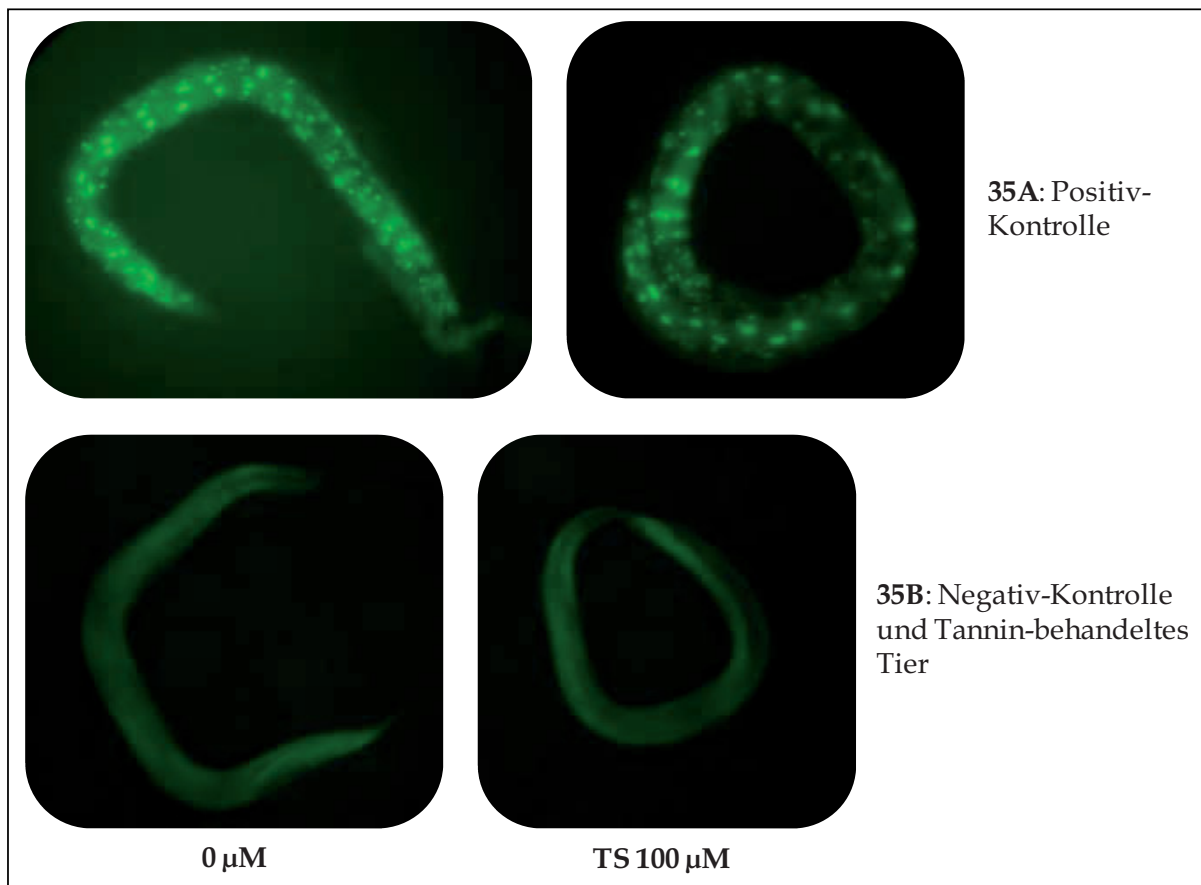


Abb. 35: Lokalisation von DAF-16::GFP nach Tannin-Exposition

Der *daf-16::daf-16-gfp;rol-6* Stamm TJ356 (*zls356*) wurde verwendet, um die Translokation von DAF-16 in den Nukleus mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar zu machen. Als Positiv-Kontrolle wurden die Tiere des Stammes für 2 Stunden 35°C ausgesetzt (A). Die übrigen Tiere wurden bei 20°C gehalten. Die Negativkontrolle (0 μM) als auch die Test-Tiere (100 μM TS, 300 μM GS, 50 μM ES und 200 μM CT) hatten ein identisches Erscheinungsbild. Exemplarisch dargestellt sind ein Kontrolltier und ein TS-behandeltes Tier (B).

4 Diskussion

Sind Tannine in der Lage, die Lebensdauer eines multizellulären Organismus signifikant zu verlängern? Die Antwort darauf scheint in dieser Arbeit gefunden und lautet: Ja. Doch die weitaus interessantere Frage ist, welche Prozesse diese Lebensverlängerung ermöglichen und welche diese begleiten. Die Komplexität der Determination der Lebensdauer und des Alterungsprozesses eröffnen eine Vielzahl von Möglichkeiten des Wirkmechanismus. Zur Diskussion stehen hier insbesondere die vermeintlich stressprotektiven antioxidativen und antimikrobiellen Effekte sowie die primär stresserzeugenden hormetischen und antinutritiven Wirkwege. Eine Vielzahl von sorgfältig ausgewählten Lebensparametern wurde in An- und Abwesenheit von Tanninen beobachtet, um die potentiell verantwortlichen Hintergrundmechanismen zu bestimmen. Im Folgenden sollen die erhaltenen Daten im Gesamtkontext analysiert werden und die möglichen Wirkmechanismen und zugrundeliegenden Theorien verifiziert werden. Die bereits in der Einleitung aufgestellten Hypothesen stellen den roten Faden dieser Diskussion dar und werden auf ihre Richtigkeit überprüft.

4.1 Überprüfung der 1. Hypothese

(Tannine erhöhen Lebensdauer und Stressresistenz und zeigen adverse Effekte auf die Fitness)

4.1.1 Modulation der Lebensdauer, Fitness und Stresstoleranz durch Tannine

Alle getesteten Tannine konnten die Lebensdauer signifikant erhöhen, wobei diese Wirkung bei TS und ES nur einem eingeschränkten Konzentrationsbereich zugeschrieben werden kann. Ein Transgenerationseffekt konnte in der F2-Generation nicht detektiert werden, jedoch ist nicht auszuschließen, dass die Wirksamkeit der Tannine nach Verwendung in weiteren Generationen durch adaptive bzw. epigenetische Veränderungen nachlässt. Auffällig ist, dass die Effektivität der TS bei 23°C wesentlich verstärkt geworden ist. Die Gründe dafür können vielfältig sein. Die Bindungseigenschaften, Bioverfügbarkeit oder Metabolisierung von TS könnten unter wärmeren Bedingungen so verändert sein, dass sich dies zusätzlich positiv auf die Lebensdauer auswirkt. Denkbar ist auch, dass die lebensverlängernde Eigenschaft von TS durch erhöhte Stresstoleranz ausgelöst wird und bei 23°C schon ein leichter thermischer Stress auftritt. Ein weiterer Temperatureffekt war bei ES und GS zu beobachten. ES konnte keine Lebensverlängerung bei 15°C Testbedingungen erzielen und GS wirkte bei 15°C relativ schwach und in den Einzelversuchen nicht signifikant. Auch hier kommen veränderte Bindungseigenschaften, Bioverfügbarkeit oder Metabolisierung der ES und GS als Ursache in Betracht. Möglich ist auch, dass ES und GS durch antibakterielle Effekte zur Lebensverlängerung führen (was im nächsten Abschnitt noch näher diskutiert wird). Da bei 15°C das Bakterienwachstum aufgrund des wesentlich höheren Temperaturoptimums von *E. coli* nur

eingeschränkt möglich ist (Hajna & Perry, 1939), verlören diese Tannine somit auch an Wirksamkeit.

Doch korreliert die beobachtete Lebensverlängerung mit erhöhter Stressresistenz, wie von Johnson et al. (1996, 2001, 2002) und Benedetti et al. (2008) postuliert? Dies trifft für TS und CT weitestgehend zu, denn beide Substanzen vermitteln erhöhte Toleranz gegenüber Hitze und oxidativen Stress in den effektivsten lebensverlängernden Konzentrationen. Andere, ebenfalls lebensverlängernde Konzentrationen, wie 25 μM TS und 100 μM CT, zeigten jedoch keine Stressresistenz. Dies könnte an der geringeren Sensitivität der Stresstests liegen, da im Gegensatz zum Lebensdauertest nur ein bestimmter Zeitpunkt betrachtet wird. Gallussäure hingegen konnte in keinem der Tests überzeugen. Nur hohe Konzentrationen zeigten signifikante Wirksamkeit gegenüber Hitzestress, jedoch keine Konzentration gegenüber oxidativem Stress. ES bewirkte sogar eine erhöhte Sensitivität gegenüber Stress. Eine gesteigerte Stresstoleranz, zumindest bezüglich H_2O_2 und Hitze, kommt also weder als Ursache noch als Konsequenz der Lebensverlängerung bei ES und GS in Frage. Stress kann jedoch sehr verschiedene Ursachen und Auswirkungen haben. Daher ist es denkbar, dass ES und GS sehr wohl protektiv gegenüber anderen Stressoren, wie z.B. Pathogenen wirken.

Ist eine Tannin-vermittelte Lebensverlängerung gleichbedeutend mit einer erhöhten individuellen Fitness? Oder zeigen sich Einbußen aufgrund einer Energie-Umverteilung zugunsten der Lebensdauer? Wachstum, Reproduktion, Mobilität und die pharyngeale Pumpfrequenz wurden als ein Maß für die Fitness untersucht. Nicht nur eine verspätete bzw. verringerte Reproduktion sondern auch ein reduziertes Wachstum kann in Konkurrenz mit anderen Tieren einen selektiven Nachteil bedeuten und so die darwinsche Fitness verringern (Arendt, 1997; Gebhardt-Henrich & Richner, 1998; Metcalfe & Monaghan, 2003). Die Mobilität ist Maß für die individuelle körperliche Fitness. Darüber hinaus kann eine reduzierte Mobilität die Flucht vor Prädatoren erschweren, so dass auch hier die darwinsche Fitness beeinflusst werden könnte. Die pharyngeale Pumpfrequenz ist aufgrund ihrer negativen Korrelation mit der Alterung (Huang et al., 2004) ein gut geeigneter Fitnessparameter.

Tabelle 11 fasst die Fitness-relevanten Ergebnisse zusammen. Die erste Reihe soll dabei verdeutlichen, welche Effekte eine gesteigerte Fitness erzeugen würde. Es wird schnell ersichtlich, dass jedes Tannin in einem oder mehreren Bereichen keinen Einfluss auf die Fitness und sogar einen Fitnessnachteil erzeugte. Tanninsäure zeigte eine Verzögerung der Reproduktion und eine Verringerung des Wachstums, jedoch keine Unterschiede in der pharyngealen Pumpfrequenz oder Gesamtproduktion. Andererseits bewegten sich TS-exponierte Tiere häufiger und, sofern sie sich in TS-freien Bakterien bewegten, auch schneller. Gallussäure zeigte in allen Bereichen, mit Ausnahme einer verzögerten Vermehrung und unveränderten Gesamtproduktion,

Fitness-Steigerungen. ES und CT hingegen konnten nur in wenigen Bereichen eine Verbesserung der Fitness verursachen.

Die Steigerung der Fitness kann als Folge verringerter Alterung und verlängerten Lebens aufgefasst werden. Da alle getesteten Tannine das Leben verlängern, jedoch die Fitnessparameter unterschiedlich variieren, ist es aber wahrscheinlicher, dass die Fitnessvariationen eher als Nebeneffekte der Tanninwirkung entstehen. Potentiell könnten Fitnessvariationen aber auch die Ursache der Langlebigkeit darstellen. So wurde berichtet, dass stärkeres Wachstum den intrazellulären, oxidativen Stress erhöht und das Leben verkürzt (Rollo, 2002), so dass ein verringertes Wachstum zu Lebensverlängerungen führen könnte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Pharynx-Pumpfrequenz CR und somit Langlebigkeit auslöst (Lakowski & Hekimi, 1998). Zudem kann eine unterdrückte Reproduktion Langlebigkeit in *C. elegans* auslösen (Hsin & Kenyon, 1999).

Tabelle 11: Übersicht über Fitness-relevante Ergebnisse

	Größe	Gesamt-reproduktion	Reproduktions-Beginn	Qualit. Mobilität	Quant. Mobilität	Pharynx-Pumpfrequenz
Anzeichen für eine erhöhte Fitness	+	+	+	+	+	+
100 µM TS	--	0	-	(+)	++	0
300 µM GS	+	0	-	+	++	+
50 µM ES	0	0	-	+	0	0
200 µM CT	--	0	0	0	(+)	++

(+)/(-) Leichte und / oder nicht signifikante Erhöhung/Verringerung

+/- Erhöhung/Verringerung

++/-- Starke Erhöhung/Verringerung

Die 1. Hypothese „Tannine erhöhen Lebensdauer und Stressresistenz und zeigen adverse Effekte auf die Fitness“ kann demnach nur teilweise bestätigt werden. Zwar zeigten alle Tannine lebensverlängernde Effekte, jedoch konnten nur TS und CT eine Verbesserung der Stresstoleranz erwirken. Alle Tannine zeigten adverse Effekte bezüglich der Fitness, jedoch in unterschiedlicher Variation.

4.2 Überprüfung der 2. Hypothese

(Kaum Relevanz der antioxidativen und antimikrobiellen Effekte)

4.2.1 Involvierung antimikrobieller Effekte in ES- und GS-vermittelter

Langlebigkeit

Die Fütterung der Nematoden erfolgte mit *E. coli*-Bakterien, die während des Proliferationsprozesses für Nematoden schädliche Metabolite produzieren (Garigan et al. 2002; Lithgow, 2003). Ein möglicher lebensverlängernder Mechanismus der Tannine könnte folglich die Inhibition des bakteriellen Wachstums und somit die Reduktion der Metabolitensynthese darstellen. Tatsächlich sind diverse antimikrobielle Effekte der Tannine bekannt. Sowohl für Tanninsäure (Chung et al., 1998a; Taguri et al., 2004; Kim et al., 2009) als auch für Gallussäure (Tesaki et al., 1999; Panizzi et al., 2002), Ellagsäure (Vattem et al., 2004; Kim et al., 2006; Hancock et al., 2010) und für Catechin (Parkar et al., 2008) wurden *E. coli*-inhibierende Eigenschaften berichtet.

TS und CT konnten jedoch auch unter Verwendung von hitzegetöteten Bakterien zu einer signifikanten Lebensverlängerung führen. Die Verhinderung der bakteriellen Proliferation erscheint als primärer Wirkmechanismus daher unwahrscheinlich. Es könnte hingegen argumentiert werden, dass die anfängliche Fütterung mit lebenden Bakterien bis zum 6. Adult-Tag ausreicht, um eine Lebensverlängerung zu erzielen und die Tannine bei anschließender Verwendung toter Bakterien wirkungslos blieben. Dies schien insbesondere für TS wahrscheinlich: TS erzielte in jungen Tieren eine stärkere Wirkung als in älteren, was durch den Vergleich der Variation von minimaler und maximaler Lebensdauer deutlich wird. Zudem bewirkte eine TS-Exposition bis zum 6. Adult-Tag einen signifikanten Anstieg der Lebensdauer. Deutlich dagegen spricht jedoch, dass die Lebensverlängerung bei Expositions-Stopp am 6. Adult-Tag sowohl mit anschließender Fütterung lebender als auch mit toter Bakterien (rund 8% bzw. 7%) wesentlich geringer ausfiel als bei lebenslanger Exposition unter Verwendung lebender bzw. toter Bakterien (rund 18% bzw. 19%). Folglich muss TS auch bei Fütterung von toten Bakterien seine lebensverlängernde Wirkung ausüben, so dass antimikrobielle Effekte als Hauptmechanismus ausgeschlossen werden können. Da eine CT-Exposition bis zum 6. Adult-Tag bei keiner der beiden Fütterungs-Szenarien zu einer Verlängerung des Lebens führte, gilt diese Schlussfolgerung auch für Catechin.

Anders sieht die Datenlage für Gallussäure und Ellagsäure aus. Bei Verwendung hitzegetöteter Bakterien konnte weder bei initialer noch bei lebenslanger Substanz-Exposition eine signifikante Lebensverlängerung erreicht werden. Die Wirkung von ES und GS auf die Lebensdauer ist somit wahrscheinlich an die Proliferation der *E. coli*-Bakterien gekoppelt. Dies muss jedoch nicht zwangsläufig bedeuten, dass diese Tannine durch Inhibition des Bakterienwachstums oder gar durch Abtöten der Bakterien zu einer Lebensverlängerung führen. Es ist ebenso möglich, dass ES und GS direkt mit den schädlichen Metaboliten reagieren und diese unschädlich machen

oder deren Aufnahme verhindern. Weiterhin ist es denkbar, dass die Tannine die Metabolitensynthese in den Bakterien inhibieren, ohne jedoch Einfluss auf die Proliferation selbst zu nehmen. Eine weitere Möglichkeit ist die Aktivierung der Stressantwort in den Nematoden, die spezifisch die Abwehr dieser Metabolite begünstigt. Um dies zu überprüfen, müssten die schädigenden Metabolite identifiziert werden und Lebensdauertests mit diesen in Abwesenheit proliferierender Bakterien unter ES- und GS-Einfluss durchgeführt werden.

4.2.2 Unzureichende Indizien für einen antioxidativen Wirkmechanismus

Der antioxidative Effekt von Tanninen kann zum Einen direkt ausgeübt werden, wie durch Chelatierung von Metallen, was zur Prävention der ROS-Formation führt, oder durch Abfangen freier Radikale, was zur Unterbrechung der Kettenreaktion führt (Soobrattee et al., 2005). Zum Anderen könnten Tannine aber auch die Synthese oder Aktivität von enzymatischen Antioxidantien oder antioxidativen Metaboliten im Tier positiv beeinflussen (Williams et al., 2004; Soobrattee et al., 2005). Doch treffen diese Mechanismen auch auf die vier getesteten Tannine zu und führen diese tatsächlich zu der beobachteten Langlebigkeit?

Die Tatsache, dass Tannine freie Radikale *in vitro* abfangen können, konnte hier mittels TOSC-Analyse bestätigt werden, wobei insbesondere TS und ES eine starke antioxidative Kapazität aufwiesen. Untersuchungen zeigten jedoch, dass die diversen antioxidativen Messmethoden mitunter stark variieren (Schlesier et al., 2002; Aruoma, 2003; Buenger et al., 2006; Magalhães et al., 2008), so dass dieses erhaltene Ergebnis mit Vorsicht zu betrachten ist. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Gallussäure eine mehr als dreifach höhere antioxidative Kapazität gegenüber dem Radikal ABTS^{•+} besitzt als Ellagsäure (Soobrattee et al., 2005), wohingegen die hier verwendete TOSC-Methode der Ellagsäure ein wesentlich stärkeres antioxidatives Potential bescheinigt als der Gallussäure. Auch wenn daher nicht eindeutig beantwortet werden kann, welches Tannin insgesamt die stärksten antioxidativen Kapazitäten aufweist, so scheint doch anhand der vielfältigen Literatur und der durchgeführten TOSC-Analyse sicher zu sein, dass alle untersuchten Tannine radikalabfangende Eigenschaften besitzen, die potentiell zu einer Lebensverlängerung beitragen könnten. Die Metall-chelatierenden Eigenschaften der Tannine wurden im Zuge dieser Untersuchung nicht überprüft, jedoch gibt es zahlreiche Berichte, die diese Eigenschaften bestätigen (Ahmed et al., 1999; Hynes & Coinceanainn, 2001; Wauters et al., 2001; Hagermann, 2002; Kraal et al., 2006; Medina et al., 2007).

Viel bedeutungsvoller ist hingegen die antioxidative Leistung *in vivo*. Die TOSC-Analysen wasserlöslicher und lipidlöslicher Metabolite von exponierten Tieren geben dazu erste Anhaltspunkte. GS- und CT-Expositionen konnten die Anzahl oder Stärke antioxidativ wirkender Metabolite augenscheinlich nicht verändern. Auch hier muss beachtet werden, dass ein anderes Testsystem durchaus zu einem positiven Ergebnis führen könnte. ES- und TS-behandelte Tiere bewirkten in diesem

Testsystem hingegen signifikante Ergebnisse. ES-behandelte Tiere wiesen eine starke antioxidative Kapazität der wasserlöslichen Phase auf, jedoch bleibt fraglich, ob dies nicht von Spuren der puren Substanz herrührt. Dies wird untermauert durch das negative Ergebnis in der lipidlöslichen Phase der ES-behandelten Tiere, in der sich aufgrund der erfolgten Phasentrennung kaum noch ES befinden dürfte. Jedoch kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass ES selektiv die Bildung wasserlöslicher Metabolite anregt. Diese Problematik besteht auch bei TS, wobei hier in beiden Phasen ein starker Effekt erzielt werden konnte. Da die lipidlösliche Phase überwiegend frei von TS sein sollte, kann von einer TS-vermittelten Anregung der antioxidativen, lipidlöslichen Metabolitensynthese ausgegangen werden. Ob dies auch für wasserlösliche Metabolite zutrifft, bleibt trotz des positiven Ergebnisses fraglich. Die potentielle Problematik der „Tannin-Verunreinigung“ der wasserlöslichen Phase könnte durch die starken Bindungs- und Präzipitationseigenschaften von TS und ES ausgelöst werden, die in GS und CT nicht so stark ausgeprägt sind (Singleton, 1981).

Die antioxidative Abwehr der Nematoden umfasst aber auch eine Vielzahl von Enzymen, wie Katalasen, Glutathion-Peroxidasen und Superoxid-Dismutasen. Die Microarray-Analyse konnte jedoch keine Hinweise einer Induktion der entsprechenden Gene durch Tanninsäure aufdecken (Daten nicht dargestellt). Es konnte sogar eine leichte Repression von *sod-5* in der qRT-PCR beobachtet werden. Es ist aber nicht auszuschließen, dass einer der anderen Tannine die Expression dieser Gene verändert. Weiterhin ist eine posttranskriptionale oder posttranslationale Regulierung enzymatischer Antioxidantien durch die Tannine möglich, die mit diesem Microarray jedoch nicht erfasst werden können.

Eine wirkungsvolle antioxidative Kapazität *in vivo* sollte sich auch durch erhöhte Toleranz der Nematoden gegenüber oxidativem Stress bemerkbar machen. Im oxidativen und thermischen Stresstest konnten aber nur TS und CT überzeugen. Thermischer Stress wirkt sich auch anregend auf die endogene ROS-Produktion aus (Finkel & Holbrook 2000; Zhang et al., 2003), so dass eine starke antioxidative Kapazität der Tannine das Überleben bei hohen Temperaturen verbessern müsste. Dies kann in diesem Fall direkt durch Abfangen der thermisch-induzierten, endogenen ROS-Moleküle, durch Steigerung der enzymatischen oder metabolischen Stressabwehr oder durch erhöhte Aktivierung von Reparaturprozessen realisiert werden. Im oxidativen Stresstest hingegen werden die vorexponierten Tiere in Abwesenheit der Tannine getestet (mit Ausnahme der Tanninmoleküle, die sich zu Beginn des Tests noch im oder am Tier befanden). Ein direktes Abfangen der zugeführten H_2O_2 -Moleküle, als auch der endogen entstehenden ROS-Moleküle durch die Testsubstanzen ist demnach kaum möglich. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die TS-Behandlung ein besseres Überleben unter Hitzestress ermöglichte, während sich CT in dem oxidativen Stresstest als wirksamer erwies. Dies könnte daran liegen, dass TS seine stressprotektive Eigenschaft

insbesondere durch das direkte Abfangen von ROS-Molekülen entfaltet, was im oxidativen Stresstest kaum zum Tragen kommt. Auch denkbar ist die selektive Aktivierung von Abwehr- oder Reparaturproteinen durch TS bzw. CT, die besonders gegen eine der beiden Stressformen wirksam ist.

Ein wichtiger Hinweis zur Beteiligung von antioxidativen Mechanismen an der lebensverlängernden Wirkung kann anhand der Lebensdauer von Tannin-behandelten *mev-1*-Mutanten gewonnen werden. MEV-1 ist eine Untereinheit des Enzym-Komplexes II der Elektronen-Transport-Kette (Ishii et al., 1998). Die Abschaltung des Gens in den Mutanten bedingt eine ROS-Überproduktion, Hypersensitivität gegenüber oxidativem Stress und vorzeitige Alterung. Sofern die antioxidative Kapazität eines Tannins maßgeblich an der Lebensverlängerung beteiligt ist, sollten *mev-1*-Tiere klar von einer Tanninexposition profitieren. Dies trifft für GS und ES zu. TS konnte zwar eine leichte Erhöhung der Lebensdauer bewirken, jedoch fällt diese wesentlich geringer aus, als bei Wildtypen. Die beschriebenen prooxidativen Kapazitäten der TS (Khan et al., 2000; Varanka et al., 2001; Labieniec et al., 2003) bieten eine mögliche Erklärung für das relativ schlechte Ergebnis in *mev-1*-Mutanten. Auch Catechin scheint leichte prooxidative Kapazitäten zu besitzen (Akagawa et al., 2003), was die Neutralisierung des Langlebigkeits-Effektes in *mev-1*-Mutanten ebenfalls erklären kann. Doch auch für GS (Akagawa et al., 2003) und ES (Labieniec et al., 2003) konnten prooxidative Eigenschaften nachgewiesen werden, eine Verlängerung des Lebens von *mev-1*-Mutanten war dennoch möglich. Die antimikrobiellen Effekte dieser beiden Substanzen könnten stark genug sein, um auch eine Lebensverlängerung in diesen Tieren zu ermöglichen und die möglichen prooxidativen Effekte zu überdecken. Darüber hinaus entscheiden verschiedene Umstände, wie das Milieu oder die Konzentration eines Stoffes, wann eine Substanz prooxidativ und wann antioxidativ wirkt (Labieniec et al., 2003; Robaszkiewicz et al., 2007; Chobot & Hadacek, 2009). Es ist also möglich, dass GS und ES unter diesen Bedingungen antioxidativ wirken.

Tabelle 12 gibt eine Zusammenfassung über die antioxidativen Testergebnisse der Tannine. Die erste Reihe gibt Hinweise, wie sich eine antioxidative Eigenschaft auswirken könnte. Trotz vieler dafür sprechender Hinweise scheint die antioxidative Kapazität der Tannine nicht der maßgebliche Mechanismus zu sein, der zur Langlebigkeit führt. Ausschlaggebend für diese Schlussfolgerung sind die sehr schwachen Auswirkungen auf *mev-1*-Mutanten durch TS und CT sowie die schlechte bzw. nicht vorhandene Schutzwirkung von GS und ES gegenüber thermischem und oxidativem Stress. Dies wird untermauert durch die Arbeiten von Doonan et al. (2008b), Gems & Doonan (2009) und Pun et al. (2010), die nachgewiesen haben, dass antioxidative Wirkungen nicht positiv mit der Lebensdauer von *C. elegans* korrelieren.

Tabelle 12: Übersicht über antioxidative Wirkungen

	TOSC ACW Tannin	TOSC ACW Homogenat	TOSC ACL Homogenat	Transkriptionale Induktion antioxidativer Enzyme	Thermische Stresstoleranz	Oxidative Stresstoleranz	Lebens- verlängerung von <i>mev-1</i> - Mutanten
Anzeichen für eine antioxidative Wirkung	+	+	+	+	+	+	+
100 μ M TS	++	+	+	0/(+)	++	+	(+)
300 μ M GS	+	0	0	N/A	(+)	0	+
50 μ M ES	++	++	0	N/A	0	-	+
200 μ M CT	+	0	0	N/A	+	++	0

(+)/(-) Leichte und / oder nicht signifikante Erhöhung/Verringerung

+/- Erhöhung/Verringerung

++/-- Starke Erhöhung/Verringerung

Die 2. Hypothese „Kaum Relevanz der antioxidativen und antimikrobiellen Effekte“ kann demzufolge nur teilweise bestätigt werden. Zwar scheint die antioxidative Kapazität tatsächlich nicht der Hauptmechanismus der Tannin-vermittelten Langlebigkeit zu sein, jedoch erwies sich die antimikrobielle Eigenschaft der Ellagsäure und Gallussäure als wahrscheinliche Ursache der Lebensverlängerung.

4.3 Überprüfung der 3. Hypothese

(Tannine wirken hormetisch und lösen einen CR-Effekt aus)

4.3.1 TS und ES sind hormetisch agierende Tannine

Son et al. (2008) diskutierten potentielle hormetische Effekte von pflanzlichen Sekundärmetaboliten. Da viele dieser Metabolite zur Abwehr gegen Schädlinge und Pathogene synthetisiert werden, sollte ein gewisses toxisches Potential vorhanden sein, welches in geringer Dosierung in anderen Organismen zu Hormesis führen könnte. Die charakteristische, (invertierte) J-förmige Dosis-Wirkungs-Kurve konnte bei Tanninsäure und Ellagsäure im Lebensdauertest nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich, dass die höchsten Konzentrationsbereiche von TS und ES auch unter Stress das geringste Überleben vermittelten. Jedoch zeigten sich bei ES und TS Nachteile in der Reproduktion und, im Falle von TS, auch im Wachstum. Hormesis wird oft als Verbesserung von Lebensparametern durch leichte Stress-Einwirkung verstanden. Wenn sich der Parameter Lebensdauer ‚verbessert‘, aber sich andere Fitnessparameter augenscheinlich ‚verschlechtern‘ (Wachstum und/oder Reproduktion), kann das insgesamt als positives Ergebnis und somit überhaupt als

Hormesis aufgefasst werden? Kendig et al. (2010) bieten einen Erklärungsansatz durch Präzisierung der Hormesis-Definition. Demzufolge wird Hormesis als Dosis-Wirkungs-Beziehung für einen einzelnen Endpunkt aufgefasst, welche durch Umkehr der Wirkung zwischen niedrigen und hohen Dosen diverser Stressoren charakterisiert ist. Elementar ist hierbei, dass sich Hormesis jeweils auf einen Endpunkt bezieht. Das bedeutet also nicht, dass die hormetische Konzentration auf alle Parameter einen günstigen Einfluss ausüben muss. Somit kann die Dosis-Wirkungskurve für jeden Endpunkt individuelle hormetische Konzentrationsbereiche umfassen. Um dies zu überprüfen, könnten Konzentrationsreihen von TS und ES bezüglich des Wachstums und der Reproduktion getestet werden. Zudem wurde in der Definition von Kendig et al. (2010) bewusst auf wertende und subjektive Begriffe wie „positiv“ oder „verbessert“ verzichtet. Somit sollte die verspätete Reproduktion und das verringerte Wachstum auch wertneutral betrachtet werden. Letztlich fehlt es aber an ausgedehnten Untersuchungen, ob und welche Nebenwirkungen eine hormetische Beeinflussung eines Lebensparameters mit sich bringt.

Weitere Belege einer hormetischen Wirksamkeit der Tanninsäure können anhand der Untersuchungen mit den Mutantenstämmen als auch mittels Microarray gefunden werden. So ist das Gen *sek-1*, welches an der Vermittlung der Pathogenresistenz beteiligt ist (Kim et al., 2002), essentiell für die Ausprägung der lebensverlängernden Eigenschaft von TS. Möglicherweise bewirkt TS eine Aktivierung des Pathogenresistenz-Signalwegs durch mimen eines pathogenen Stresses. Ist jedoch *sek-1* ausgeschaltet, so bewirkt TS eine Lebensverkürzung, da sich das Tier vermutlich nicht mehr gegen den ausgelösten Stress wehren kann. Die positive Wirkung auf die thermische Stressresistenz hingegen benötigt neben SEK-1 noch zwei weitere Faktoren, DAF-16 und DAF-12. Da beide Dauerformations-Proteine miteinander interagieren (Matyash et al., 2004) und DAF-16 die Transkription vieler Stressabwehrproteine reguliert, ist eine Beteiligung an der TS-vermittelten Stressresistenz durchaus plausibel. Dies widerspricht jedoch einem Bericht von Cypser et al. (2006), in dem die Gene *daf-12*, *daf-16* und *daf-18* für den hormetischen Langlebigkeits-Effekt verantwortlich gemacht werden, jedoch nur *daf-18* für eine hormetisch erhöhte thermische Resistenz benötigt wird. Der verwendete physikalische Stressor (Hitze) scheint Hormesis demnach auf andere Weise zu veranlassen, als die untersuchten Tannine in dieser Arbeit.

Von besonderem Interesse sind aber die im Microarray detektierten Induktionen verschiedener stressinduzierbarer Gene und Gene, die für stressabwehrende Proteine codieren. Dazu gehören insbesondere *nhr-8*, *jnk-1*, *pdp-14* und *numr-1*, welche alle mit einer Stressantwort in Verbindung stehen und somit potentiell verantwortlich für den Hormesis-Effekt in TS-behandelten Tieren sein könnten. Interessant ist auch, dass diverse Gene als auch die Gengruppe *abu* durch die lebensverlängernden Konzentrationen in anderer Weise reguliert wurden, als durch die lebens-

verkürzende Konzentration. Dies stützt die Hypothese von Steinberg et al. (2008), in der die adaptive Stressantwort als hormetischer Hauptmechanismus angezweifelt wird.

Catechin und Gallussäure bewirkten weder bei der Lebensdauer noch bei der Stressresistenz eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, die dem Prinzip der Hormesis entspricht. Denkbar ist aber, dass noch höhere Konzentrationen zu toxischen Effekten führen würden und dass die Dosis-Wirkungs-Kurven nur stark verzerrt bzw. gestreckt sind. Ob dies dann noch als Hormesis gewertet werden sollte, bleibt jedoch zweifelhaft.

4.3.2 CR scheint nicht verantwortlich für GS- und CT-vermittelte Langlebigkeit zu sein

CR ist einer der prominentesten und wirkungsvollsten Mechanismen zur Erlangung von Langlebigkeit ohne gentechnische Manipulationen. Die bislang noch nicht eindeutig identifizierten, molekularen, CR-auslösenden Hintergrundmechanismen könnten von den Tanninen aktiviert werden und so zur Langlebigkeit führen. Weiterhin könnte die Nahrungsaufnahme oder -verwertung von den Tanninen negativ beeinflusst werden, was auch zu einer CR-vermittelten Langlebigkeit führen würde. Diese potentiellen Wirkmechanismen der Tannine erscheinen besonders plausibel, da deren antinutritiven Effekte schon mehrfach überzeugend geschildert wurden (Butler, 1992; Carmona, 1996; Chung-MacCoubrey et al., 1997; Carbonaro et al., 2001). Verschiedene Tests wurden zur Bewertung dieser Hypothese hinzugezogen.

Der Attraktionstest kann Auskunft über das Fressverhalten der Nematoden geben. Wird gezeigt, dass eine Substanz gemieden wird, so kann postuliert werden, dass die Tiere im Lebensdauertest weniger substanzhaltige Nahrung zu sich nehmen würden als substanzfreie Nahrung. Dieses Prinzip könnte auf die Ellagsäure zutreffen, da die Tiere Kontrollbakterien den ES-bestückten Bakterien vorzogen. Eine völlige Nahrungsverweigerung, gleichzusetzen mit völliger Abwesenheit von Nachkommen auf den ES-haltigen Bakterienspots, konnte aber nicht festgestellt werden.

In ähnlicher Weise kann die Pharynx-Pumpfrequenz Aussagen über die aufgenommene Nahrungsmenge liefern: Je weniger Kontraktionen, desto weniger Nahrung wird aufgenommen. Die Tannin-behandelten Tiere zeigten jedoch keine signifikante Reduktion der Frequenz. GS und CT erhöhten sogar die Pumpfrequenz. Jedoch kann eine veränderte Pumpfrequenz nicht nur als Ursache, sondern auch als Konsequenz eines CR-Effektes aufgefasst werden. So zeigten Lee et al. (2006) eine Erhöhung der Pumpfrequenz in Tieren, die keinerlei Nahrung bekamen. Dies könnte eine Folge verlangsamter Alterung sein oder ein biologischer Mechanismus, welcher bei Nahrungsmangel auftritt, um die maximale Nahrungsaufnahme zu ermöglichen. Daher ist sowohl eine positiv (als Folge von CR) als auch negativ (als Ursache von CR) veränderte Pumpfrequenz ein mögliches Indiz für einen CR-Effekt. Die Tendenz zur verringerten Fettakkumulation, die in allen Tannin-behandelten Tieren gefunden

wurde, könnte ebenfalls mit einer verminderten Nahrungsaufnahme bzw. -verwertung in Verbindung stehen. Sie könnte jedoch sowohl ursächlich als auch unabhängig von CR an der Lebensverlängerung beteiligt sein (Blüher et al., 2003).

Da CR meist einhergeht mit verringerter Reproduktion (Holliday, 1989; Vanfleteren & Braeckman, 1999; Martin et al., 2008) und reduziertem Wachstum (McCay et al., 1935; Mörck & Pilon, 2006), können diese Parameter sehr aufschlussreich sein. Tatsächlich zeigten sich Einbußen im Wachstum durch Exposition mit TS und CT. GS hingegen bewirkte ein verstärktes Wachstum, was mit einem CR-Effekt kaum vereinbar ist. Obwohl TS, ES und GS eine Verzögerung der Reproduktion bewirkten, blieb die gesamte Reproduktionsleistung unbeeinträchtigt.

Die Lebensdauertests mit hitzegetöteten Bakterien können auch einen Hinweis auf einen CR-Effekt liefern. So demonstrierten Pietsch et al. (2009), dass die Fütterung mit hitzegetöteten Bakterien eine ähnliche Lebensverlängerung in *C. elegans* bewirkte wie ein kompletter Nahrungsentzug. Dies untermauern Lenaerts et al. (2008), die berichteten, dass hitzegetötete, im Gegensatz zu UV-getöteten Bakterien, einen CR-Effekt auslösen. TS und CT erlangten eine Lebensverlängerung auch in diesem Lebensdauer-Szenario. GS und ES hingegen konnten die Lebensspanne bei Fütterung hitzegetöteter Bakterien nicht verlängern. Dies könnte aber auch an den postulierten antimikrobiellen Effekten liegen, so dass ein CR-Effekt nicht als alleinige Erklärung in Frage kommt.

Die *eat-2*-Mutante weist eine verminderte Pharynx-Pumpfrequenz auf und steht somit stetig unter CR-Einfluss. Wird die Lebensverlängerung auch in diesen Tieren erlangt, so ist ein zugrundeliegender CR-Effekt für die Lebensverlängerung eher unwahrscheinlich. GS und CT zeigten sowohl in den Einzelversuchen als auch insgesamt eine lebensverlängernde Tendenz in *eat-2*-Mutanten. Vermutlich ist nur aufgrund vieler zensierter Tiere keine Signifikanz erlangt worden. Es wird daher nicht von einem CR-Effekt dieser Tannine ausgegangen. In ähnlicher Weise konnten *eat-2*-Mutanten im oxidativen Stresstest nur wenig von CT profitieren, die Tendenz ist aber auch hier erkennbar. TS zeigte jedoch widersprüchliche Ergebnisse in den Einzelversuchen. Da zwei der drei Versuche keine lebensverlängernden Effekte aufwiesen, könnte hier durchaus ein CR-Effekt vorliegen. Dies scheint aber bezüglich der thermischen Stressresistenz nicht zuzutreffen, da TS hierbei einen signifikanten Überlebensvorteil in *eat-2*-Mutanten bewirkte. ES zeigte als einziges Tannin eindeutig keine positiven Effekte auf die *eat-2*-Mutante. Dies könnte zum Einen an einem ES-ausgelösten CR-Effekt liegen, der in dieser Mutante nicht weiter zum Tragen kommt, da CR bereits ausgelöst wurde. Zum Anderen könnten die antimikrobiellen Wirkungen von ES hier ihre Wirksamkeit verlieren, da *eat-2*-Tiere viel weniger *E. coli*-Bakterien aufnehmen und so weniger von den schädlichen Einflüssen der Metabolite betroffen sind.

Schließlich soll die *sir-2.1*-Mutante betrachtet werden, welche unter TS- und CT-Exposition getestet wurde. Obwohl kontrovers diskutiert (Houthoofd & Vanfleteren,

2006; Kaeberlein et al., 2006; Tsuchiya et al., 2006; Greer & Brunet, 2009), wird häufig eine Beteiligung von SIR-2.1 am CR-Effekt beschrieben (Tissenbaum & Guarente, 2001; Wood et al., 2004; Wang & Tissenbaum, 2006; Wolff & Dillin, 2006). Da jedoch TS und CT sowohl im Lebensdauertest als auch im Stresstest positive Effekte auf *sir-2.1*-Mutanten zeigten, finden sich hier keinerlei Anhaltspunkte für einen CR-Mechanismus. Laut Guarente (2008) soll auch der Transkriptionsfaktor SKN-1 maßgeblich an dem CR-Effekt beteiligt sein. Auch in der *skn-1*-Mutante konnten jedoch TS und CT ihre Wirksamkeit entfalten. Und schließlich könnte die DAF-16-Translokation, welche nach Hungerstress auftritt, ein Indikator für CR sein. Dies trifft auf keines der Tannine in den getesteten Konzentrationen zu. Es kann hier argumentiert werden, dass der durch die Tannine ausgelöste CR-Effekt recht schwach ist und daher die Translokation kaum zu erkennen ist.

Zur Klärung, ob die Tannine via CR agieren, soll auch hier eine kleine Übersicht helfen (**Tabelle 13**). Die erste Reihe zeigt dabei, wie das Ergebnis aussehen müsste, um auf einen CR-Effekt zu deuten. Es ist demzufolge unwahrscheinlich, dass Gallussäure über den CR-Signalweg agiert. Zwar würde die verringerte Fettsäureakkumulation, die erhöhte Pharynx-Pumpfrequenz als auch die Ineffektivität bei Verwendung toter Bakterien dafür sprechen. Diese Beobachtungen könnten jedoch auch eine Folge verlangsamter Alterung und antimikrobieller Effekte sein. Insbesondere die leicht positiven Ergebnisse in *eat-2*-Mutanten und beim Wachstumstest sprechen gegen einen CR-Effekt. Ein ähnliches Bild zeichnet sich für Catechin ab. Hier ist insbesondere der positive Effekt auf die CR-relevanten Mutanten als auch auf Tiere, die mit toten Bakterien gefüttert wurden, der größte Widerspruch zu einem CR-Effekt. Die Ergebnisse für Tanninsäure sind weniger eindeutig. Eine Lebensverlängerung in *eat-2*-Mutanten konnte insgesamt nicht beobachtet werden und ein weiterer Hinweis für einen CR-Effekt findet sich in der Microarray-Studie: *sodh-1* wurde durch TS induziert; ein Effekt, der auch in Folge der Verwendung eines axenischen Mediums, was wiederum CR auslöst, auftritt. Da viele andere Tests jedoch gegen einen CR-Effekt sprechen, wie die verstärkte Attraktion, die Lebensverlängerung bei hitzegetöteten Bakterien und bei *sir-2.1*- und *skn-1*-Mutanten sowie die unveränderte Pumpfrequenz, kann davon ausgegangen werden, dass CR zumindest nicht die alleinige Ursache der Lebensverlängerung durch TS ist. Ellagsäure hingegen weist viele Merkmale auf, die für einen CR-Effekt sprechen. Einzig die Unveränderlichkeit der Gesamtproduktion und des Wachstums sowie die Lokalisation von DAF-16 sprechen dagegen. Der durch ES ausgelöste CR-Effekt ist vermutlich nicht komplett ausgeprägt, was deutlich an der schwachen lebensverlängernden Wirkung im Kontrast zu einem ‚echten‘ CR-Effekt ersichtlich wird, so dass diese „CR-Nebenwirkungen“ eventuell noch nicht messbar in Erscheinung treten.

Tabelle 13: Übersicht über CR-relevante Testergebnisse

	Attraktion	Pharynx-Pumpfrequenz	Fettakkumulation	Anzahl der Nachkommen	Wachstum	DAF-16-Translokation	Lebensdauer / Stressresistenz mit			
							N2 & tote OP50	<i>eat-2</i> -Mutanten	<i>sir-2.1</i> -Mutanten	<i>skn-1</i> -Mutanten
Anzeichen für einen CR-Effekt	-	-/+	-	-	-	+	0	0	0	0
100 µM TS	+	0	-	0	--	0	++	0	++	++
300 µM GS	++	+	(-)	0	+	0	0	(+)	N/A	N/A
50 µM ES	-	0	(-)	0	0	0	0	(-)	N/A	N/A
200 µM CT	0	++	(-)	0	--	0	++	(+)	++	++

(+)/(-) Leichte und / oder nicht signifikante Erhöhung/Verringerung

+/- Erhöhung/Verringerung

++/-- Starke Erhöhung/Verringerung

Zusammenfassend trifft die 3. Hypothese „Tannine wirken hormetisch und lösen einen CR-Effekt aus“ nur auf Tanninsäure und Ellagsäure zu. Beide Tannine zeigten ausgeprägte, hormetische Eigenschaften und einige Indizien, die für einen CR-Effekt sprechen. Ob die beiden Mechanismen gekoppelt sind und der CR-Effekt Auslöser der Hormesis ist, oder ob hier zwei unterschiedliche Wirkwege aktiviert werden, bleibt jedoch unklar. Gallussäure und Catechin hingegen scheinen weder über hormetische noch über ausreichend CR-nachahmende Kapazitäten zu verfügen.

4.4 Überprüfung der 4. Hypothese

(Spezifische Gene und Signalwege vermitteln die Tanninwirkung)

4.4.1 DAF-16 und der IIS sind nicht Hauptursache der Langlebigkeit

Der IIS ist eine der am häufigsten untersuchten, Lebensdauer-modulierenden Signalkaskaden. Der Insulinrezeptor DAF-2 bewirkt die Inhibition des Transkriptionsfaktors DAF-16, unter anderem via AGE-1 und AKT-2. Durch Aktivierung und Translokation von DAF-16 in den Nukleus werden diverse Genexpressionen positiv reguliert, darunter Gene, die für Antioxidantien, Detoxifizierungsenzyme und Reparaturproteine codieren. Die Inhibition von DAF-2 und die damit verbundene Aktivierung von DAF-16 führt somit zu erhöhter Stressresistenz und Langlebigkeit (Kenyon et al., 1993; Vanfleteren & Braeckman, 1999; Lee et al., 2003; Mukhopadhyay et al., 2006).

In diesem Zusammenhang gibt es eine Vielzahl von Proteinen, die den IIS oder DAF-16 direkt beeinflussen. So transferiert JNK-1 Stresssignale via Phosphorylierung und

aktiviert letztlich DAF-16 (Oh et al., 2005; Wolf et al., 2008), und der Steroidhormonrezeptor DAF-12 führt zur Akkumulation von DAF-16 in neuronalen Zellkernen (Matyash et al., 2004). Der Transkriptionsfaktor SKN-1 wird durch AKT-2 reguliert und reguliert die Stressantwort parallel zu DAF-16 (Tullet et al., 2008) und die Histon-Deacetylase SIR-2.1 ist an der Aktivierung von DAF-16 beteiligt, indem sie sich direkt an den Transkriptionsfaktor im Zellkern bindet (Berdichevsky et al., 2006). Mutantenstämme dieser Gene profitierten alle durch Tanninsäure-Behandlung im Sinne einer verlängerten Lebensdauer und sind somit wohl nicht verantwortlich für die TS-induzierte Langlebigkeit. Bestärkt wird dies durch die fehlende DAF-16-Translokation nach TS-Exposition. Interessanterweise war jedoch keine Verbesserung der thermischen Resistenz in *daf-12* und *daf-16*-Mutanten durch TS möglich. Es ist also wahrscheinlich, dass TS DAF-12 und nachfolgend auch DAF-16 aktiviert und so zu einer erhöhten Stressresistenz führt. Auf die Langlebigkeit scheint dieser Prozess jedoch keinen Einfluss zu nehmen.

Auch die lebensverlängernde Wirkung von Catechin scheint nicht durch den IIS oder durch DAF-16 reguliert zu werden. Wichtigster Anhaltspunkt dieser Feststellung ist die beobachtete Lebensverlängerung und erhöhte Stressresistenz in *daf-16*-Mutanten sowie der fehlende Nachweis einer DAF-16-Translokation. Allerdings konnte keine Lebensverlängerung in *daf-2*- und *akt-2*-Mutanten erlangt werden, beides Schlüsselemente des IIS. Da jedoch DAF-16 keine Relevanz für die Langlebigkeit zu haben scheint, muss es alternative Erklärungsmöglichkeiten unabhängig vom IIS geben. Tatsächlich berichteten Quevedo et al. (2007), dass AKT-1 und AKT-2 maßgeblich an der negativen Regulation der durch DNA-Schäden hervorgerufenen Apoptose in der Keimbahn von *C. elegans* beteiligt sind. Dieser Prozess soll unabhängig von DAF-16 und dem IIS stattfinden und ist somit ein möglicher, CT-induzierter Stressabwehr-Mechanismus. Auch für das Versagen von CT in *daf-2*-Mutanten gibt es eine IIS-unabhängige Erklärung. Yu & Larsen (2001) zeigten, dass *dao-3* (**D**auer or **A**ging adult **O**verexpression) und *hsp-90* (**H**eat **S**hock **P**rotein) von DAF-2 in einem DAF-16-unabhängigen Signalweg reguliert werden. Beide alternativen Mechanismen von AKT-2 und DAF-2 sind in der Stressabwehr involviert und könnten somit potentiell auch zur CT-vermittelten Lebensverlängerung beitragen. Die oxidative Stressresistenz in CT-behandelten Tieren scheint hingegen von AGE-1 abhängig zu sein, aber ebenfalls nicht von DAF-16. Henderson & Johnson (2001) zeigten, dass eine *age-1*-Mutation nicht die erwartete DAF-16-Translokation zur Folge hatte. Dies könnte auch auf einen zusätzlichen, DAF-16-unabhängigen Mechanismus von AGE-1 deuten. Dieser Mechanismus ist meines Erachtens noch nicht bestätigt und identifiziert worden, so dass hier weitere Untersuchungen zur Klärung des Sachverhaltes nötig sind.

4.4.2 Mitglieder der OSR-1/UNC-43/SEK-1-Kaskade sind involviert

Wilson et al. (2006) machten den OSR-1/UNC-43/SEK-1-Signalweg, welcher in die osmotische Stressresistenz involviert ist, für die positiven Auswirkungen der Blaubeerpolyphenole verantwortlich. Pietsch et al. (2009) zeigten, dass UNC-43 und SEK-1, aber nicht OSR-1 für die Lebensverlängerung durch Quercetin mitverantwortlich sind. Tanninsäure ist jedoch nur von SEK-1 abhängig und kann durchaus ohne OSR-1 oder UNC-43 zur Langlebigkeit und erhöhten Stressresistenz führen. SEK-1 ist Bestandteil einer MAPK-Kaskade und kann unterhalb von UNC-43 agieren, um das neuronale Zellschicksal zu regulieren (Millet & Ewbank, 2004; Young & Dillin, 2004). Kim et al. (2002) beschreiben, dass SEK-1 aber auch unabhängig von UNC-43 und OSR-1 fungieren kann, um die Pathogenresistenz zu regulieren. Daher kann angenommen werden, dass TS SEK-1 aktiviert und die Resistenz gegenüber Pathogenen erhöht, was letztlich zur Langlebigkeit und zur verbesserten Stressresistenz führt. Jedoch bleiben zwei Fragen unbeantwortet: Warum führt die Beseitigung des pathogenen Stresses durch Fütterung mit toten Bakterien nicht zu einem Wegfall des TS-vermittelten Langlebigkeits-Effektes? Eine mögliche Erklärung ist, dass SEK-1 nicht nur selektiv gegen pathogenen Stress wirkt, sondern gegen diverse Stressoren. Und wie kann der toxische Effekt von 100 μM TS in *sek-1*-Mutanten erklärt werden? Eine Möglichkeit ist, dass TS selbst wie ein Pathogen agiert und SEK-1 gegen diese schädlichen Auswirkungen von TS schützt. Wird SEK-1 ausgeschaltet, so kann TS ungehindert seine toxischen, Pathogen-ähnlichen Wirkungen entfalten. Es bleibt aber fraglich, ob die Aktivierung der SEK-1-vermittelten Pathogenabwehr der Hauptmechanismus zur Erlangung der Langlebigkeit ist, oder ob es sich hierbei nur um einen Inhibitor der toxischen Effekte von TS handelt. Unklar ist in diesem Zusammenhang auch die leichte Repression von *sek-1*, die sich sowohl im Microarray als auch in der qRT-PCR zeigte. Denkbar wäre eine Art Rückkopplung, bei der aktiviertes SEK-1 die weitere SEK-1-Synthese durch Regulierung der Genexpression verringert.

Catechin entfaltet seine lebensverlängernde Wirkung ohne UNC-43, OSR-1 oder SEK-1. Jedoch scheinen UNC-43 und SEK-1 für die Vermittlung der oxidativen Stressresistenz eine entscheidende Rolle zu spielen. UNC-2 und UNC-36 sind Bestandteile eines Calciumkanals, welcher die Typ II Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CaMKII) UNC-43 aktiviert. Das Signal führt über TIR-1 (Toll and Interleukin 1 Receptor domain protein), NSY-1 (Neuronal SYmmetry) und SEK-1 zur Inhibition von STR-2 (Sagasti et al., 2001; Kondo et al., 2005). Das Transmembranprotein STR-2 (Seven TM Receptor) ist ein Geruchsrezeptor, welcher bei Inhibierung zu einer verlängerten Lebensdauer führt (Alcedo & Kenyon, 2004). Kondo et al. (2005) zeigten darüber hinaus, dass dieser MAPK-Signalweg in Verbindung mit DAF-16 anstelle von STR-2 auch an der Regulierung der oxidativen Stressantwort beteiligt ist. Die Beteiligung von DAF-16 erscheint aber bei der CT-vermittelten oxidativen Stressresistenz unwahrscheinlich oder zumindest nicht essentiell, da die Stressresistenz auch in *daf-16*-Mutanten erhöht war. Daher scheint

ein Wirken über STR-2 oder andere, bislang nicht identifizierte Faktoren, wahrscheinlicher.

4.4.3 Weitere, potentiell verantwortliche Proteine

Die Genexpressionsstudien von TS-behandelten Tieren offenbarten weitere Proteine, die möglicherweise an der Regulation der TS-vermittelten Langlebigkeit beteiligt sind. Die interessantesten sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Von besonderem Interesse für die Tanninsäure-vermittelte Wirkung ist das Metall-induzierbare Protein NUMR-1. Es zeigte sowohl im Microarray als auch in der qRT-PCR eine äußerst starke Induktion, wie sie durch eine hohe Cadmium-Konzentration zu erwarten gewesen wäre. Dass aber viele andere bekannte Cd-induzierbare Gene nicht induziert oder gar reprimiert wurden, gibt Rätsel auf. TS scheint also weder einen Cd-ähnlichen Effekt zu bewirken noch scheint eine Cd-Kontamination vorzuliegen. Dass NUMR-1 ursächlich an der Lebensverlängerung beteiligt ist, erscheint unwahrscheinlich. Zunächst steigt die Stärke der Induktion mit der Konzentration, wohingegen die Lebensdauer mit Erhöhung der Konzentration sinkt. Zudem liegen keine Berichte zur Verknüpfung von Langlebigkeit und NUMR-1 vor. Dies bestätigt sich auch in *numr-1*-Mutanten, die keine verringerte Lebensdauer aufwiesen. Zuletzt konnte gezeigt werden, dass *numr-1*-Mutanten von TS profitieren, so dass NUMR-1 nicht essentiell für die lebensverlängernde Eigenschaft der TS ist. Wahrscheinlich ist NUMR-1 hier als Stressindikator zu werten, welcher sehr spezifisch auf einen von der Tanninsäure ausgelösten Stress oder aber auf TS selbst reagiert.

Eine Repression von *cav-1* stellten Reichert & Menzel (2005) in Folge von Xenobiotika-Expositionen fest. Auch 100 μ M TS regulierte *cav-1* am 1. und 10. Adult-Tag herunter, bewirkte aber eine Induktion am 3. und 6. Adult-Tag. Diese Induktion könnte dazu beitragen, dass die verspätet eingesetzte Reproduktion ausgeglichen werden kann, denn eine *cav-1*-Überexpression schützt gegen eine durch Stress erwirkte Reproduktions-Reduktion (Parker & Baylis, 2009). Die zunächst erfolgte Repression hingegen ist wieder Indiz für die stressauslösende Aktivität von TS. Aufgrund der Wirksamkeit von TS in *cav-1*-Mutanten scheint *cav-1* aber nicht essentiell für die Lebensverlängerung zu sein. CAV-1 wird darüber hinaus eine Interaktion mit dem Protein PES-2.1 bescheinigt, welches an der Determination der Lebensdauer beteiligt ist (www.wormbase.org). Ein Mutantenstamm von PES-2.1, welcher bislang noch nicht verfügbar ist, konnte nicht getestet werden. Die Repression durch TS könnte aber auf eine Beteiligung an der lebensverlängernden Wirkung deuten. Natürlich muss auch hier wieder bedacht werden, dass die Repression durch 300 μ M TS am stärksten war, 300 μ M TS jedoch nicht lebensverlängernd wirkt.

Ein weiterer interessanter Kandidat ist das Transmembranprotein PGP-14, welches in allen Konzentrationen hochreguliert wurde. Dieses Protein zeigt Homologien zu vertebralen MDR-Proteinen (Multi Drug Resistance) (Sheps et al., 2004) und könnte

so durch verbesserte Ausschleusung von Toxinen aus der Zelle an der TS-vermittelten Stressresistenz und Langlebigkeit beteiligt sein.

Pup-2 und *glp-1*, die bei Ausschaltung zu Langlebigkeit führen (Arantes-Oliveira et al., 2002; Hamilton et al., 2005; Curran & Ruvkun, 2007), sind am 1. und 3. Adult-Tag durch 100 und 200 μM TS herunterreguliert worden, im älter werdenden Tier jedoch kaum. Eine Verschiebung des Alterungsprozesses im jungen Tier könnte sich auch auf die gesamte Lebensdauer auswirken. Da eine Exposition von TS bis zum 6. Adult-Tag jedoch nicht die vollständige lebensverlängernde Wirkung zeigte, muss TS auch im älteren Tier lebensverlängernd agieren. Eine Regulation der beiden Gene im jungadulten Tier ist nicht ausreichend, um die lebensverlängernden Effekte gänzlich zu erklären. Im Gegensatz dazu wurde *lys-10*, was laut Samuelson et al. (2007) bei Inhibition lebensverlängernd wirken kann, insbesondere in post-reproduktiven Tieren herunterreguliert. Dies könnte ein Hinweis sein, dass je nach Lebensabschnitt verschiedene Gene an der Lebensverlängerung beteiligt sind.

Potentiell an der Lebensverlängerung beteiligt könnte auch die Sphingomyelinase ASM-3 sein, deren Genexpression durch TS herunterreguliert wurde, was auch zu Langlebigkeit und erhöhter Stressresistenz führen kann (Kim & Sun, 2007). Jedoch ist der Studie von Kim & Sun auch zu entnehmen, dass inhibiertes ASM-3 in Abhängigkeit von DAF-16 zur Langlebigkeit führt, so dass ASM-3 vermutlich nicht die Hauptverantwortung des TS-Effektes trägt.

Viele dieser soeben beschriebenen potentiell beteiligten Gene zeigten eine besonders hohe Beeinflussung durch 300 μM TS. Wie kann das mit der fehlenden lebensverlängernden Eigenschaft dieser Konzentration zu erklären sein? Möglich ist natürlich, dass diese Gene nicht an der Lebensverlängerung beteiligt sind und nur Nebeneffekte der TS darstellen. Es gibt aber auch Hinweise, dass 300 μM TS insgesamt zu viel Stress auf die Tiere ausübt, und so die lebensverlängernde Wirkung in den Hintergrund gedrängt wird. Die starke Anschaltung der *abu*-Gene, welche in niederen Konzentrationen nicht zu finden ist, kann als guter Indikator eines erhöhten Stresslevels gewertet werden. So sind die *abu*-Gene an der korrekten Proteinfaltung beteiligt und eine erhöhte Induktion könnte ein Hinweis auf eine stressinduzierte Fehlfaltung von Proteinen durch 300 μM TS sein. Weitere Hinweise finden sich in der GO-Analyse, die aufzeigt, dass wesentlich mehr Gruppen durch 300 μM TS als durch die anderen Konzentrationen reguliert wurden. Auch denkbar ist, dass die sehr hohe Induktion eines Gens mit einem sehr hohen Energieaufwand verknüpft ist, so dass die Tiere diese Energie einem anderen, notwendigen Prozess, entziehen.

Eine besondere Betrachtung verdienen das Prion-ähnliche Protein PQN-60 und die ATPase CATP-3. Die Besonderheit ist hier nicht, dass diese Proteine bekannte Regulatoren der Langlebigkeit oder Stresstoleranz sind, denn dies ist meines Erachtens noch nicht hinreichend untersucht worden. Nein, die auffällige konzentrationsabhängige Expression ist hier das entscheidende Merkmal. So

erwirkten die lebensverlängernden Konzentrationen 100 und 200 μM TS eine Repression, die tendenziell lebensverkürzende Konzentration 300 μM TS jedoch keinerlei Veränderung oder gar eine Induktion. Dies ist ein wichtiger Hinweis, dass 300 μM TS und somit vermutlich auch 400 μM TS nicht nur stärker wirken, sondern auch eine qualitativ andere Wirkung zeigen. So zeigt sich hier auch molekular eine dosisabhängige Umkehr der Wirkung, wie sie phänotypisch schon auszumachen war. Eine Beteiligung dieser Gene an dem durch TS ausgelösten Hormesis-Effekt und somit auch an der Langlebigkeit ist demnach durchaus denkbar. An dieser Stelle soll auch darauf hingewiesen werden, dass die Repression von *pqn-60* zu einer gesteigerten Apoptose-Rate führt. Dies könnte ein möglicher Mechanismus für den tumorhemmenden Effekt der TS sein, der u.a. in Kamei et al. (1999) beschrieben ist. Auch für die Catechin-vermittelte Langlebigkeit kommt ein weiteres Protein in Betracht: NHR-8. Obwohl entbehrend für die erhöhte oxidative Stressresistenz, so ist NHR-8 doch essentiell für die CT-ausgelöste Langlebigkeit. NHR-8 ist Bestandteil des Biotransformationssystems, welches den Xenobiotikametabolismus reguliert (Lindblom et al., 2001). Weiterhin soll NHR-8 als Regulator der Cytochrom P450 Gene (CYPs) agieren. Durch Catechin-vermittelte Aktivierung von NHR-8 könnte das Biotransformationssystem angekurbelt werden, und so den Abbau von toxischen und potentiell lebensverkürzenden Substanzen verbessern. Ebenfalls besteht die Möglichkeit, dass Catechin selbst ein Substrat für die NHR-8-regulierte Biotransformation darstellt, und so zu einem Produkt transformiert wird, welches erst die Langlebigkeit auslöst.

Die 4. Hypothese „Spezifische Gene und Signalwege vermitteln die Tanninwirkung“ scheint sich anhand der Genexpressions-Daten und der Versuche mit verschiedenen Mutantenstämmen zu bestätigen. Viele Gene, die an der Bestimmung der Lebensdauer und / oder an der Regulierung der Stressresistenz beteiligt sind, sind potentiell an der CT- und TS-vermittelten Langlebigkeit und Stressresistenz beteiligt. Mit Ausnahme der DAF-16-Translokation, welche sich nicht bestätigt hat, wurde diese Hypothese für GS und ES nicht überprüft, so dass hierzu keinerlei Aussagen getroffen werden können.

4.5 Überprüfung der 5. Hypothese

(Hypothese: Die Mitohormesis-Theorie, Xenohormesis-Hypothese, „Green Theory of Ageing“ und die „Disposable Soma Theory“ spiegeln sich in der Tanninwirkung wider)

4.5.1 Keine einheitliche Alterungs-Theorie zur Beschreibung der Tanninwirkung

Die bereits in der Einleitung dargestellten Alterungs-Theorien sollen nun anhand der erhaltenen Daten überprüft werden. Diese Studie kann jedoch nur Indizien für oder wider eine Theorie liefern. Zur endgültigen Verifizierung der Theorien müssten verschiedene Organismen unter weitaus mehr Bedingungen getestet werden.

Die „**Free Radical Theory of Ageing**“ ist wohl eine der populärsten Alterungs-Theorien. Dennoch ist es unwahrscheinlich, dass sie der Tannin-vermittelten Langlebigkeit in *C. elegans* zugrundeliegt, da Antioxidantien, welche der ROS-Akkumulation entgegenwirken, häufig zu keiner Lebensverlängerung in den Fadenwürmern führten (Doonan et al., 2008b; Gems & Doonan, 2009; Pun et al., 2010). Doch kann das in dieser Untersuchung bestätigt werden? ES und TS zeigten insbesondere in hohen Konzentrationen toxische Eigenschaften. Wären TS und ES antioxidativ aktiv, würden sie vermutlich mit steigender Konzentration auch vermehrt ROS abfangen können. Dies würde laut der Theorie zu einem noch längeren Leben führen, was sich hier jedoch nicht gezeigt hat. Labieniec et al. (2003) zeigten hingegen, dass die Tannine TS, ES und GS in Zellen der Flussmuschel *Unio tumidus* in niederen Konzentrationen antioxidativ, in höheren jedoch prooxidativ wirken. Dies würde zu den hier beobachteten Effekten passen und spräche wiederum für die Theorie der freien Radikale. Allerdings scheint die antioxidative Kapazität nicht die Hauptursache der Tannin-vermittelten Langlebigkeit zu sein. Aufgrund der schlechten Wirksamkeit in *mev-1*-Mutanten kann bei TS und CT sogar von einer prooxidativen Wirkung der lebensverlängernden Konzentrationen ausgegangen werden. Zudem wirken GS und ES kaum gegen zugeführten Stress, bei welchem auch ROS-Moleküle generiert werden. Insgesamt scheint die „Free Radical Theory of Ageing“ den Wirkmechanismus der hier untersuchten Tannine nicht zu beschreiben. Dies trifft folglich auch auf die verwandte „**Mitochondrial Theory of Ageing**“ und die „**Rate of Living Theory**“ zu.

Im Gegensatz dazu erscheint die **Mitohormesis**-Theorie wesentlich plausibler als Erklärungsmoment für die Wirkung von TS. Zum Einen weist TS eine hormetische Dosis-Wirkungs-Beziehung auf, welche durchaus auch aus der dosisabhängigen Generierung von ROS resultieren könnte. Dass die lebensverlängernde Wirkung in *mev-1*-Mutanten kaum zu beobachten ist, entspricht ebenfalls der Theorie. Da diese Mutanten bereits an einer ROS-Überproduktion leiden, würde sich die zusätzliche Synthese weiterer ROS in diesem Falle nicht positiv auswirken. Fraglich ist in diesem Zusammenhang aber, warum die ebenfalls gegenüber oxidativem Stress hypersensitive Mutante *skn-1* sehr wohl von TS profitiert. Der Nachweis, ob diese Theorie tatsächlich den TS-Mechanismus beschreibt, müsste auf verschiedene Weise

erfolgen. Es müssten weitere ROS-hypersensitive Mutanten mit TS exponiert und auf ihre Lebensdauer überprüft werden. Wildtypen sollten zudem TS und zusätzlich verschiedenen Antioxidantien in einzelnen Tests ausgesetzt werden. Sollte sich der TS-Effekt neutralisieren und keine Langlebigkeit mehr zu beobachten sein, wäre dies ein Indiz für eine vorliegende Mitohormesis. Zuletzt sollten endogene ROS-Moleküle quantifiziert werden, um zu ermitteln, ob TS-behandelte Tiere wirklich mehr ROS generieren als Kontrolltiere. Da CT und GS keine hormetische Dosis-Wirkungs-Beziehung aufweisen und da GS und ES zu einer signifikanten Lebensverlängerung in *mev-1*-Mutanten führten, spiegelt sich die Mitohormesis-Theorie nicht in diesen Wirkwegen wider.

Um die **Xenohormesis**-Hypothese zu bestätigen, bedarf es paradoxerweise nicht einer hormetischen Wirk-Umkehr in höheren Konzentrationen. Howitz & Sinclair (2008) beschreiben, dass sich der Wortbestandteil „Hormesis“ auf die Aktivierung der Stressantwort bezieht, und nicht auf die hormetische Dosis-Wirkungs-Beziehung. Eine echte Hormesis sei aber in Addition zum Xenohormesis-Effekt durchaus denkbar. Die Involvierung von Stressantwort-Mechanismen konnte sowohl in TS- als auch in CT- behandelten Tieren entdeckt werden, was sowohl zur Xenohormesis-Hypothese als auch zur klassischen Hormesis passen würde. Die Involvierung von Sirtuinen, die laut Howitz et al. (2003) den Xenohormesis-Effekt auslösen, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Sowohl die CT- als auch TS-vermittelte Langlebigkeit und Stressresistenz kann in Abwesenheit von SIR-2.1 erfolgen. Howitz und Kollegen postulieren weiterhin, dass xenohormetisch-wirkende Substanzen CR nachahmen und so zur Langlebigkeit führen. TS und ES scheinen über gewisse CR-auslösende Kapazitäten zu verfügen, die vermutlich auch zur Langlebigkeit beitragen. Auf CT und GS scheint das jedoch nicht zuzutreffen. Gemäß der Hypothese müssten zudem die Substanzen in den Pflanzen durch Stress induzierbar sein. Die Catechin-Synthese ist in Pappeln durch Wund-, Pathogen- und UVB-Stress (Miranda et al., 2007; Mellway et al., 2009) induzierbar. Bennett & Wallsgrove (1994) zeigen zudem eine Vielzahl von Beispielen für Stress-induzierbare Tannin-Synthesen auf. Letztlich kann aber nur eine großflächige Untersuchung die Xenohormesis-Hypothese für diese Tannine überprüfen. Dazu müssten verschiedene Pflanzen verschiedenen Stressoren ausgesetzt werden und der Gehalt an ES, GS, TS und CT bestimmt werden. Die Art des Stressors, welcher die Tanninsynthese in den Pflanzen induziert, sollte sich zudem in der Stressantwort der Nematoden wiederfinden. Denn es wäre im Sinne der Xenohormesis-Hypothese, dass sich der „Xeno“-Organismus auf den richtigen, bevorstehenden Stress vorbereiten kann. Diese Untersuchung liefert insgesamt nur wenige Hinweise auf einen „Xenohormesis-Hintergrundmechanismus“.

Die „**Green Theory of Ageing**“ scheint sich für die CT-vermittelte Langlebigkeit zu bestätigen. Die Proteine DAF-2 und AKT-2 sind an der Stressantwort beteiligt und NHR-8 ist ein Regulator des Biotransformationssystems. Die drei entsprechenden Gene sind essentiell für die lebensverlängernde Wirkung von CT und könnten durch

Verbesserung der Toxinabwehr ursächlich an der Lebensverlängerung beteiligt sein. Gems & McElwee (2005) sprachen sich jedoch für eine Beteiligung des IIS an der Detoxifikation gemäß der „Green Theory“ aus. Obwohl DAF-2 und AKT-2 eine essentielle Rolle im CT-Mechanismus spielen, so ist jedoch DAF-16 als entscheidender Effektor des IIS entbehrlich. Da die Detoxifikation und Stressabwehr auf vielfältige Weise reguliert sein kann, spricht dieses Ergebnis nicht zwangsläufig gegen die „Green Theory of Ageing“. Die Ergebnisse der Lebensdauertests von verschiedenen Mutantenstämmen unter TS-Exposition erbrachten keine Hinweise auf die „Green Theory“. Zwar ist eine Beteiligung von SEK-1 an der Lebensverlängerung wahrscheinlich, jedoch wird SEK-1 insbesondere mit der Pathogenabwehr und der Immunität in Verbindung gebracht, und nicht mit der Detoxifikation. Auch die Microarray-Analyse erbrachte keine Hinweise auf die „Green Theory of Ageing“. Die von Gems & McElwee (2005) postulierten beteiligten CYPs, UGTs (UDP-GlucuronosylTransferase) und SDRs (Short-chain Dehydrogenase/Reductase) werden von 100 μ M TS nicht oder nur marginal induziert (Daten nicht angegeben). Yao et al. (2008) beschrieben sogar eine hemmende Wirkung von TS auf CYPs und Phase II Enzyme der Maus. Nur NHR-8 wurde leicht induziert, jedoch sind NHR-8 und die Mitglieder des IIS nicht relevant für die lebensverlängernde Wirkung, so dass die Theorie wohl nicht auf die Wirkungsweise von TS zutrifft. Für GS und ES kann die Theorie nicht überprüft werden, da weder ausgedehnte Mutanten-Tests noch Genexpressionsanalysen vorgenommen wurden.

Die „**Disposable Soma Theory**“ spiegelt sich nicht in der Wirkungsweise von GS und ES wieder. Die postulierte Energieumverteilung von den Sektoren Wachstum und Reproduktion auf den Sektor Reparatur & Erhaltung, was sich positiv auf die Lebensdauer auswirken müsste, sollte sich durch verringertes Wachstum oder Einbußen in der Reproduktion bemerkbar machen. Eine verzögerte Reproduktion bei unveränderter Gesamtproduktion, wie sie bei GS, ES und TS sichtbar wurde, ist vermutlich kein Indiz für die Theorie, da sich der Energieaufwand für die Reproduktion wohl nicht verändert, sondern nur verschoben hat. ES bewirkte zudem keine Einschränkungen im Wachstum und GS-behandelte Tiere wurden sogar größer als die Kontrolltiere. Im Gegensatz dazu bewirkten CT und TS parallel zur Lebensverlängerung Einbußen im Wachstum. Dies ist im Sinne der „Disposable Soma Theory“. Zudem fällt in der GO-Analyse auf, dass Wachstumsprozesse schon bei 100 μ M TS molekular reguliert werden. Eine Energieumverteilung könnte demnach die Lebensverlängerung durch CT und TS begleiten. Morgan et al. (2000) beschreiben zudem eine inverse Korrelation von Wachstum und Proteinumsatz und Rollo (2002) sowie Metcalfe & Monaghan (2003) diskutieren die negative Verknüpfung von Wachstum und Lebensdauer. Dies untermauert die Möglichkeit einer Langlebigkeit durch Wachstumsminderung.

Die 5. Hypothese „Die Mitohormesis-Theorie, Xenohormesis-Hypothese, ‚Green Theory of Ageing‘ und die ‚Disposable Soma Theory‘ spiegeln sich in der Tanninwirkung wider“ kann teilweise bestätigt werden. Die TS-Wirkung wird sehr gut durch die Mitohormesis-Theorie und die „Disposable Soma Theory“ beschrieben, und die CT-Wirkung durch die „Green Theory of Ageing“ und die „Disposable Soma Theory“. Die „Free Radical Theory of Ageing“ erscheint für keines der Tannine als Beschreibung geeignet. Die Xenohormesis-Hypothese kann durchaus den Hintergrund der Tanninwirkung beschreiben, es sind jedoch weitere Untersuchungen zur Einschätzung notwendig. Die „Disposable Soma Theory“ und Mitohormesis-Theorie beschreiben den Wirkmechanismus von GS und ES nicht und sind somit nicht als theoretisches Wirk-Modell für diese Tannine geeignet. Die „Green Theory of Ageing“ kann anhand der vorliegenden Daten für GS und ES nicht abgeschätzt werden. Ein einheitliches Bild und somit eine besonders gut geeignete Hintergrund-Theorie kristallisiert sich hier jedoch nicht heraus.

4.6 Überprüfung der 6. Hypothese

(Hypothese: Jedes Tannin weist individuelle Wirkwege auf)

4.6.1 Tannine weisen individuelle Wirkwege auf

Nun stellt sich die Frage, ob ein universales Tannin-Prinzip aus den erhaltenen Daten ermittelt werden kann. **Abb. 36-39** geben einen Überblick über die vermuteten Wirkwege der vier getesteten Tannine. **Abb. 36** erweckt im Vergleich mit den übrigen Abbildungen den Eindruck, dass TS die meisten Wirkwege beeinflusst. Da die Priorität dieser Arbeit auf die Tanninsäure als effektivste lebensverlängernde Substanz gelegt wurde, wurden durch eine vermehrte Auswahl an Biotests und molekularbiologischen Tests auch mehr Daten generiert. Bei weitergehender Analyse könnten auch die anderen Tannine ein wesentlich komplexeres Wirkmuster aufweisen.

Im Zentrum des TS-Mechanismus steht vermutlich der Hormesis- und der CR-Effekt (**Abb. 36**). Der Hormesis-Effekt könnte auf milden prooxidativen Kapazitäten, im Sinne einer Mitohormesis, und auf pathogenen Wirkungen und der darauf folgenden Pathogenantwort via SEK-1 basieren. Der Hormesis-Effekt könnte ferner in Verbindung mit der dosisabhängigen Regulierung von *pqn-60* und *catp-3* stehen. Die antinutritiven Eigenschaften der TS scheinen zu einer verringerten Nahrungsverwertung zu führen, die letztlich einen CR-Effekt auslöst. Da diskutiert wird, dass CR auch ein milder Stress ist, könnte auch dieser zu einem Hormesis-Effekt führen. Das verringerte Wachstum könnte ebenfalls eine Folge des CR-Effektes sein oder auch direkt von der TS durch molekulare Regulation ausgelöst werden. In der Wachstumsverminderung spiegelt sich die „Disposable Soma Theory“ wider und die Hemmung des Wachstums könnte ursächlich an der Lebensverlängerung beteiligt sein. Auch die verringerte Fettakkumulation, vermutlich ausgelöst durch die

reduzierte Nahrungsverwertung und den CR-Effekt, könnte ebenfalls direkt zur Lebensverlängerung beitragen. Schließlich erwies sich TS auch als potenter molekularer Regulator. Selbst 100 μM TS führte zu einer differentiellen Expression von über 600 Genen. Das Diagramm beinhaltet einige der potentiell Lebensdauer-relevanten Gene. Es ist auch denkbar, dass einige dieser Gene für die lebensverlängernden Effekte der Hormesis und der CR mitverantwortlich sind. *Nhr-8* und *jnk-1* wurden zwar differentiell exprimiert, erschienen aber irrelevant für die Lebensverlängerung. Sie spielen daher vermutlich nur eine untergeordnete Rolle. Schließlich führt die Alterungsverzögerung zu einer Verschiebung von altersabhängigen Parametern, wie einem späteren Einsetzen der Mobilitäts-Einbußen und des Reproduktionsbeginns. Interessant ist, dass die Stressresistenz, zumindest bezüglich Hitzestress, vermutlich durch einen zusätzlichen DAF-12- und DAF-16-abhängigen Weg reguliert wird.

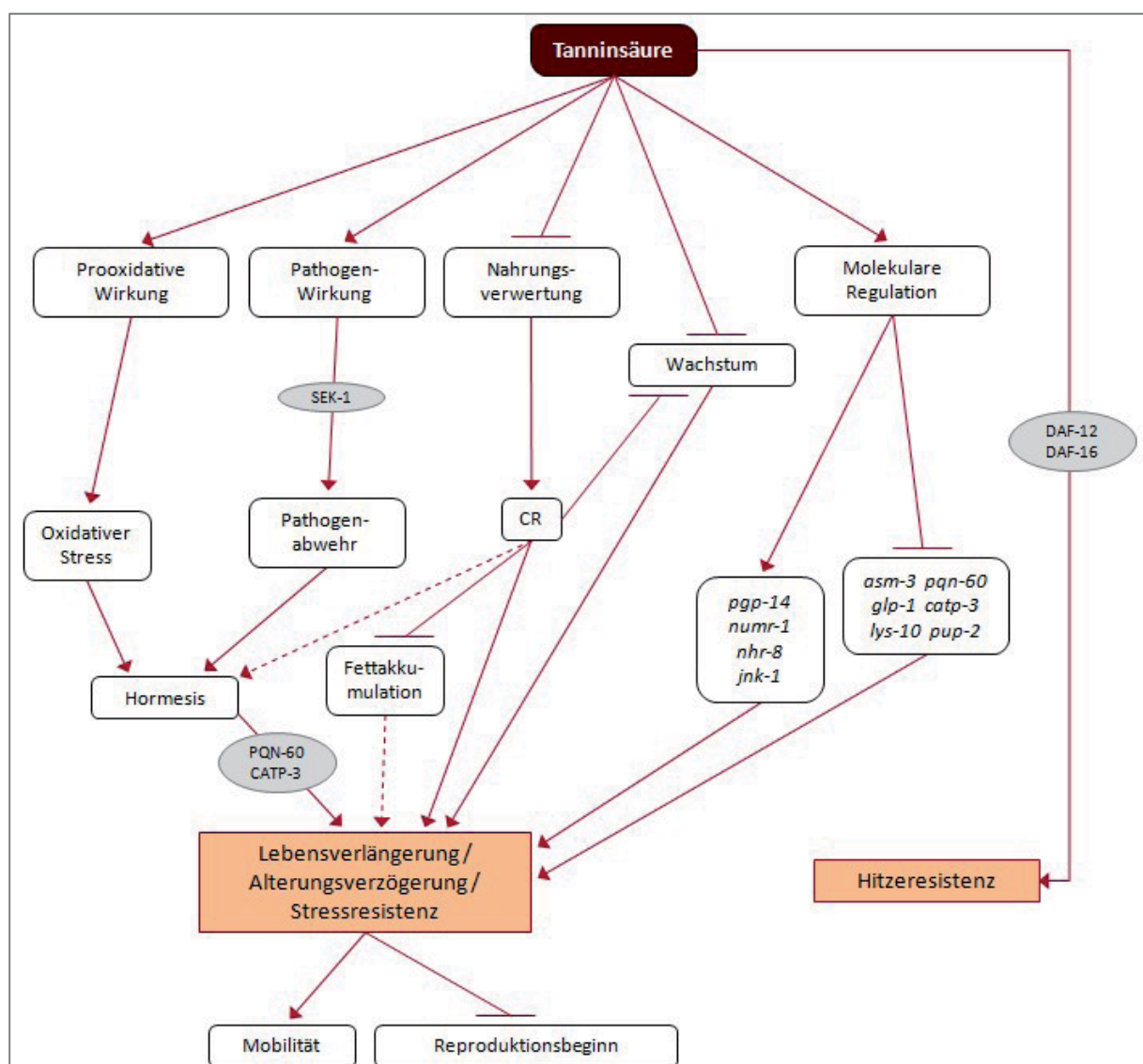


Abb. 36: Mechanismen der Tanninsäure-Wirkung

Das Diagramm illustriert mögliche Wirkwege der Tanninsäure, die potentiell an der Lebensverlängerung und Stressresistenz beteiligt sind. Die postulierten Mechanismen beziehen sich auf 100 μM TS.

Ellagsäure (**Abb. 37**) scheint einen bislang nicht näher definierten toxischen Stress auszulösen, der in einem kleinen Wirkungsbereich zu hormetischer Langlebigkeit führt. Dieser Wirkungsbereich weist leicht negative Konsequenzen auf die Stressresistenz auf, so dass vermutlich noch kleinere Konzentrationen nötig sind, um einem positiven Effekt in diesem Bereich auslösen zu können. Die verminderte Attraktion und die beschriebenen antinutritiven Wirkungen könnten der Auslöser einer CR sein, welche wiederum die Fettakkumulation reduziert und zur Langlebigkeit führt. Als zentraler, lebensverlängernder Mechanismus wird jedoch die antimikrobielle Eigenschaft der ES gesehen. Die Verzögerung der Alterung hat schließlich wieder Wirkungen auf Mobilität und Reproduktion zur Folge.

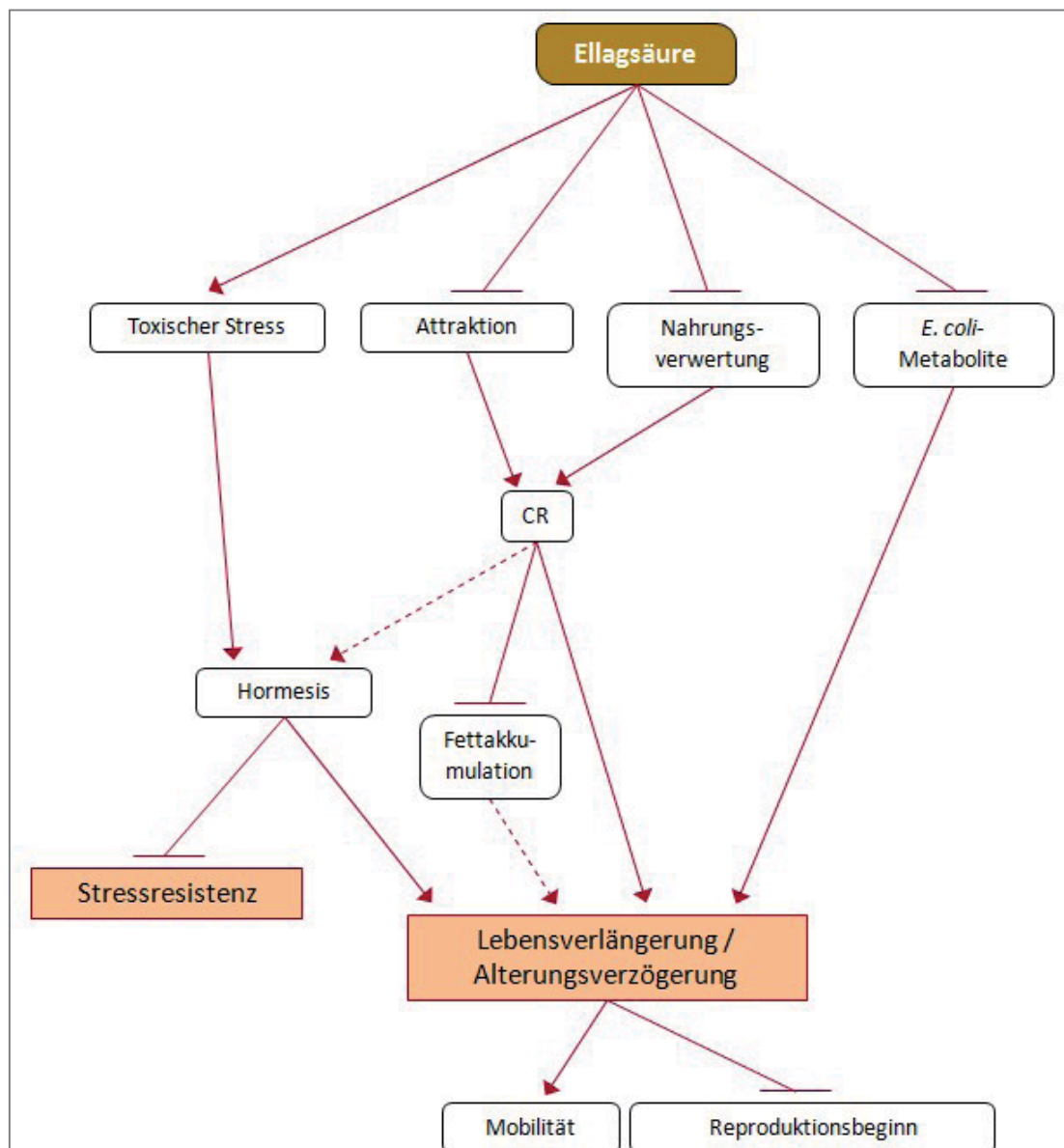


Abb. 37: Mechanismen der Ellagsäure-Wirkung

Das Diagramm illustriert mögliche Wirkwege der Ellagsäure, die potentiell an der Lebensverlängerung und Stressresistenz beteiligt sind. Die postulierten Mechanismen beziehen sich auf 50 μM ES.

Gallussäure (**Abb. 38**) könnte ihre Wirkung über die Inhibition der Fettakkumulation und der *E. coli*-Metabolite erlangen. Die Alterungsverzögerung scheint sich hier auch positiv auf die Pharynx-Pumpfrequenz auszuwirken. Vermutlich wirken sich TS und ES aufgrund ihrer antinutritiven Wirkung hemmend auf die Pumpfrequenz aus, so dass der positive Effekt durch Verzögerung der Alterung bei diesen Tanninen neutralisiert wird.

Catechin (**Abb. 39**) scheint zwei distinkte Wirkwege zur Erlangung der Stressresistenz und der Langlebigkeit zu aktivieren, in die individuelle Gene involviert sind. Auch hier könnten verringertes Wachstum und reduzierte Fettakkumulation potentiell zur Lebensverlängerung beitragen. Warum Catechin jedoch nicht zu einer Verzögerung der Reproduktion oder Verbesserung der Mobilität führt, bleibt fraglich. Allein die erhöhte Pharynx-Pumpfrequenz zeugt von einer verlangsamten Alterung.

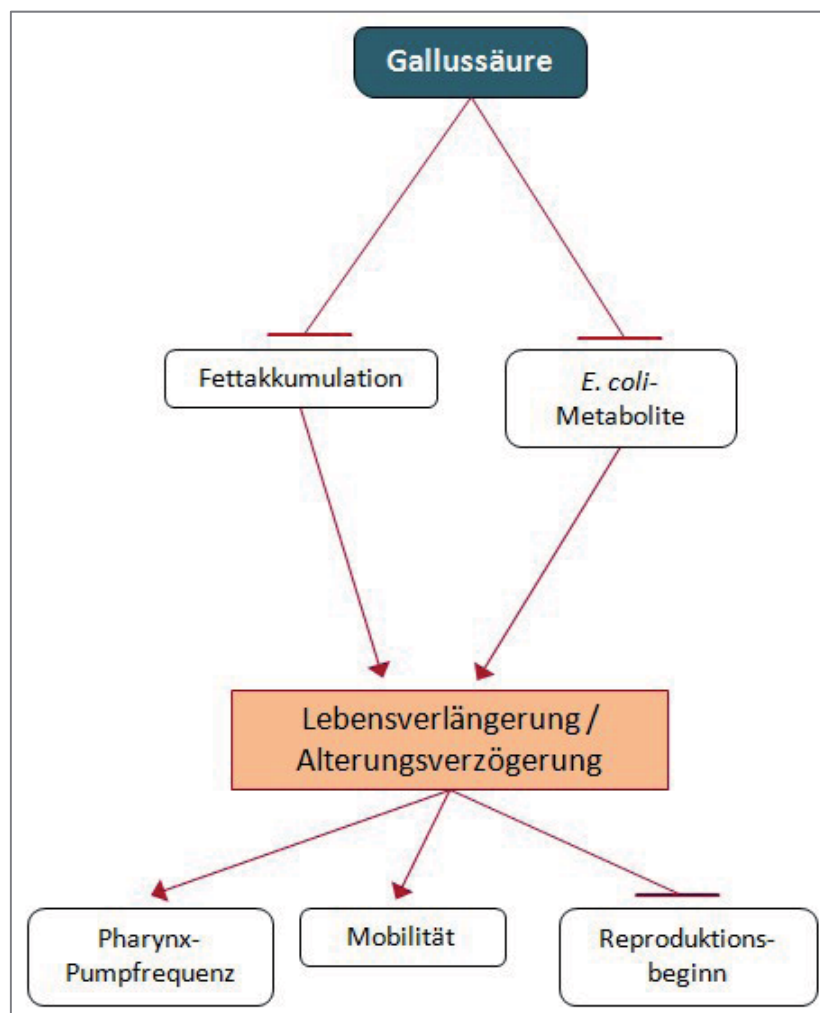


Abb. 38: Mechanismen der Gallussäure-Wirkung

Das Diagramm illustriert mögliche Wirkwege der Gallussäure, die potentiell an der Lebensverlängerung und Stressresistenz beteiligt sind. Die postulierten Mechanismen beziehen sich auf 300 µM GS.

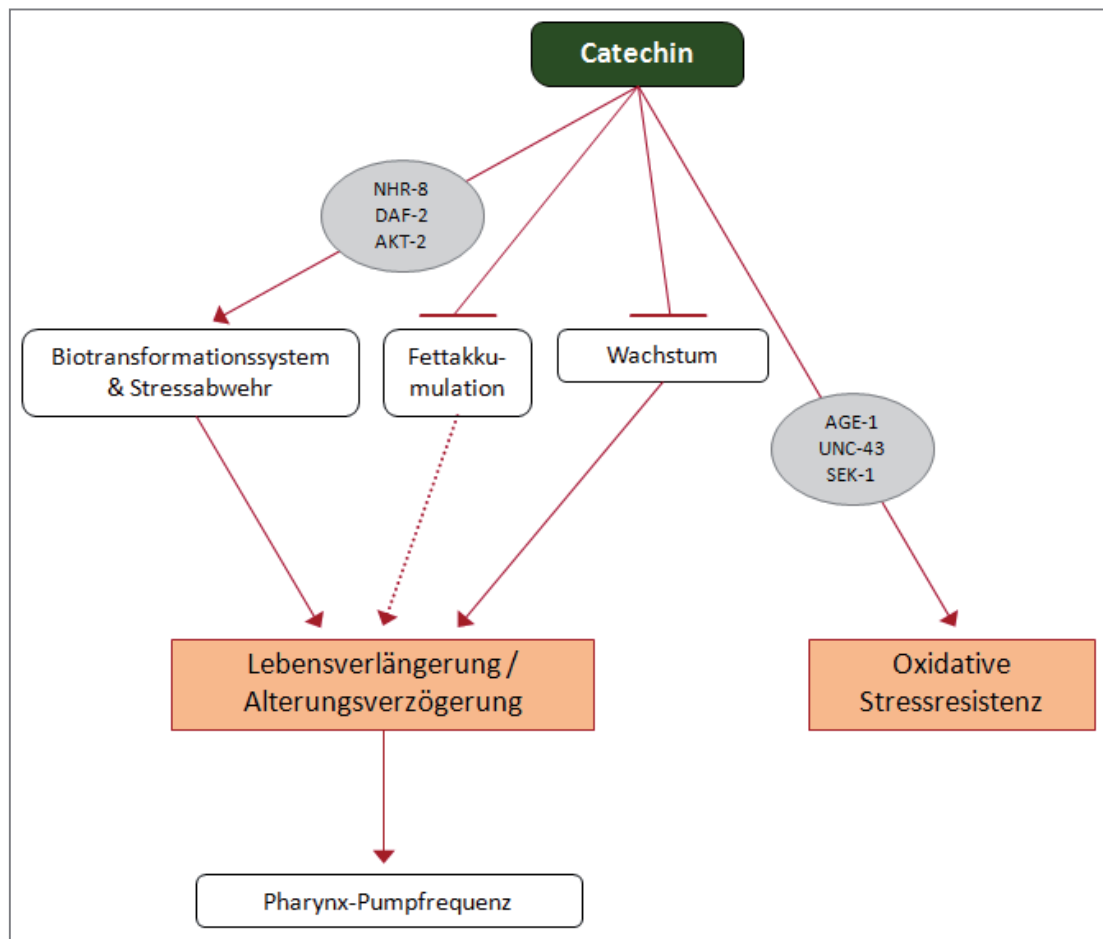


Abb. 39: Mechanismen der Catechin-Wirkung

Das Diagramm illustriert mögliche Wirkwege von Catechin, die potentiell an der Lebensverlängerung und Stressresistenz beteiligt sind. Die postulierten Mechanismen beziehen sich auf 200 μ M CT.

Daraus kann gefolgert werden, dass jedes Tannin ein eigenes Wirkprinzip aufweist. Einzig die verminderte Fettsakkumulation und die erzeugte Langlebigkeit scheinen universelle Beobachtungen zu sein. Zudem kann festgestellt werden, dass Langlebigkeit und Stressresistenz nicht zwangsläufig gekoppelt sein müssen und über distinkte Wege reguliert werden können.

Ein Vergleich mit anderen natürlichen Substanzen soll nun klären, ob die Tannine „Wirk-Doppelgänger“ besitzen oder ob die Tanninwirkungen bislang einzigartige Beobachtungen sind. **Tabelle 14** fasst Studien mit *C. elegans* und natürlichen Substanzen in alphabetischer Reihenfolge zusammen, in denen Tests zur Lebensdauer und/oder Stressresistenz durchgeführt wurden. Der Fokus soll hier insbesondere auf die entgegengesetzten Wirkungen gelegt werden, die eine identische Wirksamkeit ausschließen.

Besonders aussagekräftig sind die Studien zur Wirkung der Polyphenole Quercetin, Kaffeesäure und Rosmarinsäure, da hier eine ähnliche Auswahl an Testparametern untersucht wurde und da die Untersuchungen Großteils in den gleichen Laboratorien durchgeführt wurden, wie die der Tannine. **Kaffeesäure** und

Rosmarinsäure scheinen über den OSR-1/UNC-43/SEK-1-Signalweg und über eine Regulation von SIR-2.1 und DAF-16 (bei Kaffeesäure) zu einer Lebensverlängerung und Stressresistenz zu führen. Diese Wirkwege sind nicht hauptverantwortlich für die Wirkung von TS und CT, so dass hier keine relevante Übereinstimmung gefunden werden kann. **Quercetin** zeigte ausgeprägte antioxidative Wirkungen und zeigte keinen Effekt auf die Körperlänge. Dies stimmt nicht mit der Wirkungsweise von CT und TS überein. Interessant ist aber die Neutralisierung des positiven Effektes auf die Stressresistenz bei Ausschaltung von *age-1*, *daf-2*, *unc-43* und *sek-1*. Mit Ausnahme von *daf-2* sind diese Gene vermutlich auch für die stressresistente Wirkung von CT verantwortlich. Vielleicht teilen sich Quercetin und CT einen gemeinsamen, für die Stressresistenz verantwortlichen Mechanismus. Der Hormesis-Effekt und die starke antioxidative Wirkung von Quercetin sprechen jedoch gegen eine einheitliche Gesamtwirkung von Quercetin und CT. Eine Beteiligung von DAF-16 an der Quercetin-Wirkung wurde sowohl bestätigt als auch dementiert. Die beschriebene Quercetin-ausgelöste Translokation von DAF-16 konnte in Tannin-exponierten Tieren zumindest nicht nachgewiesen werden. Die lebensverlängernde Eigenschaft bei Verwendung toter Bakterien aller drei Polyphenole deckt sich zudem nicht mit den Wirkungen der ES und GS. Keiner dieser Substanzen scheint der Wirkungsweise der getesteten Tannine zu entsprechen.

Der untersuchte, polyphenolreiche **Blaubeer-Extrakt** scheint ebenfalls über den OSR-1/UNC-43/SEK-1-Signalweg zur Lebensverlängerung zu führen. Trotz Analogien zur TS, wie die gute Wirkung auf die thermische, aber weniger auf die oxidative Stressresistenz und die Neutralisierung der Langlebigkeit in *mev-1*-Mutanten und Analogien zur CT, wie die erhöhte Pharynx-Pumpfrequenz und ebenfalls die Neutralisierung der Langlebigkeit in *mev-1*-Mutanten, erscheint eine Beteiligung von OSR-1 am TS- und CT-Wirkmechanismus eher unwahrscheinlich. Eine Überschneidung mit GS und ES findet sich zwar in einigen Details, wie die auch bei GS gefundene erhöhte Pharynx-Pumpfrequenz oder die auch bei ES nicht erfolgte Langlebigkeit bei 15°C, jedoch kann der Blaubeer-Extrakt keine Lebensverlängerung in *mev-1*-Mutanten bewirken und antibakterielle Wirkwege wurden ausgeschlossen. Beides steht im Gegensatz zur ES und GS.

EGCG enthält Catechin- als auch Gallussäure-Elemente, und ist daher von besonderem Interesse für diesen Vergleich. Nur eine Studie konnte eine Lebensverlängerung nachweisen, aber alle Studien beschrieben eine verbesserte Stressresistenz. Die erhöhte thermische und oxidative Stressresistenz stimmt nicht mit der Wirkungsweise von GS und ES überein und die erhöhte Lebensdauer in *mev-1*-Mutanten sowie die starke beschriebene antioxidative Wirkung widerspricht den Ergebnissen der TS und von CT.

Resveratrol wurde bereits mehrfach mit widersprüchlichen Ergebnissen untersucht. Die vermutete Involvierung von SIR-2.1 als auch die unveränderte Körperlänge würde zumindest gegen eine Übereinstimmung mit CT und TS sprechen. Die

beobachtete Erhöhung der Stressresistenz ist darüber hinaus ein Merkmal, dass mit der Wirkung von ES und GS schlecht vereinbar ist.

Die lebensverlängernde Wirkung der **α -Liponsäure** ist, im Gegensatz zu TS und CT, abhängig von DAF-16 und eine Beteiligung des IIS wird als Hauptmechanismus für die Lebensverlängerung angegeben. Die unveränderte Pharynx-Pumpfrequenz stimmt nicht mit der Wirkungsweise von GS überein. Zur ES-Wirkungsweise gibt es zwar keine Widersprüche, jedoch mit Ausnahme der Lebensverlängerung und der unveränderten Pumpgeschwindigkeit auch kaum Übereinstimmungen. Für eine bessere Beurteilung der α -Liponsäure sollte eine Dosis-Wirkungs-Kurve für die Lebensdauer und Stressresistenz aufgestellt werden. Auch die Überprüfung der Reproduktion und des Wachstums wären hilfreich. Dann kann auch ein sinnvoller Vergleich zur ES hergestellt werden. Ähnliches gilt für die Studie mit **Coenzym Q10**. Die Lebensverlängerung in *mev-1*-Mutanten zeigt an, dass der Effekt nicht identisch mit dem von CT oder TS sein kann. Dies kann für ES und GS nicht ausgeschlossen werden, aber anhand der zu geringen Datenlage auch nicht bestätigt werden.

Die **Fisetin-** als auch **Kaempferol**-Wirkung entspricht recht eindeutig keinem der Tannine. Die Translokation von DAF-16 konnte in keinem Tannin gefunden werden, die antioxidative Kapazität als Hauptmechanismus widerspricht insbesondere TS und CT und die erhöhte thermische Resistenz ist insbesondere nicht in ES-behandelten Tieren zu finden. In ähnlicher Weise kann auch **Ginkgo Biloba** nicht überzeugen. Die Erhöhung der thermischen und oxidativen Stressresistenz in N2 widerspricht dem Wirkmechanismus von GS und ES, und die Erhöhung in *mev-1*-Mutanten widerspricht TS. CT hingegen zeigte sowohl in *mev-1*-Mutanten als auch in N2 erhöhte Stressresistenz und hatte ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Pharynx-Pumpfrequenz. Der vermutete antioxidative Hauptmechanismus kann jedoch nicht auf die CT-vermittelte Langlebigkeit zutreffen, da *mev-1*-Mutanten nicht länger unter CT-Einfluss lebten. Interessant wäre daher ein Lebensdauertest mit Ginkgo Biloba in *mev-1*-Mutanten, um ein wichtiges Indiz für die Übereinstimmung der Wirkmechanismen zu erhalten.

Einige der untersuchten **Huminstoffe** zeigten interessante Übereinstimmungen mit der Wirkung von TS, wie die hormetische Lebensverlängerung, die Regulation von Stressabwehr-relevanten Genen und die erhöhte Attraktion. Die Reproduktion wurde zwar durch TS nicht verringert, jedoch verzögert, so dass durchaus ein ähnlicher Mechanismus vorliegen könnte. Einzig die für die Huminstoff-Wirkung verantwortlich gemachten antioxidativen Kapazitäten stimmen nicht mit der TS-Wirkung überein. Eine Überprüfung der Huminstoff-vermittelten Langlebigkeit in *mev-1*-Mutanten wäre zur Überprüfung sinnvoll. Da Tannine einer der Hauptbestandteile in Huminstoffen sind, erscheint eine Wirkübereinstimmung durchaus plausibel.

Extrakte des Rosenwurz *Rhodiola rosea* und der Taigawurzel *Eleutherococcus senticosus* zeigten hormetische Langlebigkeit und eine erhöhte Stressresistenz. Dies

beschreibt die Wirkung der TS, jedoch bewirkte *E. senticosus* eine Lebensverlängerung in *mev-1*-Mutanten und scheidet somit als TS-beschreibende Substanz aus. *R. rosea* hingegen kann nicht in *mev-1*-Mutanten wirken, bewirkt aber eine DAF-16-Translokation. Dies spricht erneut gegen einen identischen Mechanismus.

Zu **Rutin** wurden leider keine Lebensdauertests durchgeführt und der Hitzestresstest fiel negativ aus. Daher ist hier ein Vergleich schwierig. Dies gilt auch für die Studien mit **Tocopherol** und **Tocotrienol**. Hier sind weitere Daten notwendig, um effektiv einen Vergleich durchzuführen. Unter Verwendung von **Wisconsin Ginseng** konnte keine Lebensverlängerung detektiert werden, so dass hier kein Vergleich sinnvoll ist.

Vitamin E erwies sich hingegen als lebensverlängernd in N2, aber nicht in *mev-1*-Mutanten, und verzögerte die Reproduktion. Hier könnte es Überschneidungen zu TS geben. Jedoch wurde die Gesamtproduktion durch Vitamin E verringert, was bei TS nicht der Fall war. Der vermutete Vitamin E-Mechanismus beschreibt dennoch sehr gut die Ergebnisse der GO-Analyse von TS, derzufolge Entwicklungs-, Reproduktions- und Wachstumsprozesse wesentlich reguliert worden sind. Ein ähnlicher Wirkmechanismus könnte demnach durchaus vorliegen.

Bei Vergleichen dieser Art ist wichtig zu bedenken, dass die Versuchsbedingungen teilweise sehr stark voneinander abweichen. So können verschiedene Mutantenstämme desselben Gens zu sehr unterschiedlichen Phänotypen führen, was eindrucksvoll anhand von *daf-2* (Gems et al., 1998) und *daf-12* (Fisher & Lithgow, 2006) beschrieben wurde. Die erhaltenen Ergebnisse von Substanzexpositionen sind daher in unterschiedlichen Mutantenstämmen nur bedingt vergleichbar. Die Stresstests sind zudem in vielen Varianten durchführbar. So kann oxidativer Stress durch H₂O₂, durch Juglon oder durch Paraquat simuliert werden. Hitzestress kann bei unterschiedlichen Temperaturen und Inkubationszeiten durchgeführt werden. Eine Fülle weiterer Variationsmöglichkeiten der Testdurchführungen weist darauf hin, dass der hier durchgeführte Vergleich nur ein Indiz für oder gegen eine mögliche Übereinstimmung liefern kann. Erst wenn beide zu vergleichenden Substanzen unter den gleichen Versuchsbedingungen mit vielzähligen Testparametern getestet werden, sind verlässliche Aussagen möglich. Der hier durchgeführte Vergleich deutet jedoch auf eine große Vielzahl an möglichen Wirkwegen hin und unterstreicht die Individualität von den zumeist lebensverlängernden Polyphenolen und anderen natürlichen Substanzen.

Die 6. Hypothese „Jedes Tannin weist individuelle Wirkwege auf“ kann somit bestätigt werden. Es gibt jedoch einige Wirk-Überschneidungen zu anderen natürlichen Substanzen, welche erst nach simultaner Überprüfung weiterer Testparameter abschließend bewertet werden können.

Tabelle 14: Studien zum Einfluss natürlicher Substanzen auf *C. elegans*

Substanz	Beobachtungen in <i>C. elegans</i> bei Substanz-Exposition	Vermutete Mechanismen	Referenz
α -Liponsäure	<ul style="list-style-type: none"> • Lebensverlängerung • Verringerter H_2O_2-Gehalt in N2 & <i>daf-16</i>-Mutanten • Unveränderte Pharynx-Pumpfrequenz • Verbesserung des Chemotaxis-Index • Keine Lebensverlängerung in <i>daf-16</i>-Mutanten • Keine verzögerte Aβ-induzierte Muskel-Paralyse 	<ul style="list-style-type: none"> • Insulin/IGF-1-Signalweg 	Brown et al., 2006
Blaubeer-Extrakt	<ul style="list-style-type: none"> • Lebensverlängerung bei 20°C & 25°C, aber nicht bei 15°C • Vermehrtes pharyngeales Pumpen • Thermische (aber nicht oxidative) Stressresistenz • Verzögerte alterungsbedingte Veränderung der <i>hsp</i>-Expressionen • Keine Lebensverlängerung in <i>mev-1</i>, <i>osr-1</i>, <i>sek-1</i> & <i>unc-43</i> -Mutanten, aber in <i>sir-2.1</i>, <i>daf-16</i> & <i>skn-1</i>-Mutanten • Kein Effekt auf das bakterielle Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • OSR-1/UNC-43/SEK-1-Signalweg 	Wilson et al., 2006
Coenzym Q10	<ul style="list-style-type: none"> • Lebensverlängerung in N2 & <i>mev-1</i>-Mutanten • Modulation der mitochondrialen Superoxidanion-Produktion in N2 & <i>mev-1</i>-Mutanten • Unterdrückung der Apoptose in <i>mev-1</i>-Embryonen 	<ul style="list-style-type: none"> • Reduktion von oxidativem Stress in Mitochondrien 	Ishii et al., 2004
EGCG	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Lebensverlängerung • Erhöhte thermische & oxidative Stressresistenz • Verbesserter Chemotaxis-Index • Reduktion des H_2O_2-Levels in N2, aber nicht in <i>daf-16</i>-Mutanten • Erhöhte Pharynx-Pumpfrequenz • Verzögerte Bewegungs-Abnahme • Verzögerte Aβ-induzierte Muskel-Paralyse • Induktion der <i>sod-3</i>, <i>skn-1</i> & <i>hsp-16.2</i> -Expression 	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhter Energieumsatz • Verbesserte ROS-Eliminierung • Induktion von <i>sod-3</i>, <i>hsp-16.2</i> & <i>skn-1</i> 	Brown et al., 2006; Zhang et al., 2009
	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte Lebensdauer in N2 & <i>mev-1</i>-Mutanten • Verbesserte oxidative Stressresistenz • Reduktion des intrazellulären H_2O_2-Level & der Juglon-induzierten Expression von <i>hsp-16.2</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidative Mechanismen 	Abbas & Wink, 2009
Fisetin	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte thermische Resistenz • Reduzierte ROS-Akkumulation unter Hitzestress • Translokation von DAF-16 in den Nukleus 	<ul style="list-style-type: none"> • Modulation der DAF-16-Aktivität • Antioxidative Kapazität 	Kampkötter et al., 2007a

Fortsetzung Tabelle 14

Substanz	Beobachtungen in <i>C. elegans</i> bei Substanz-Exposition	Vermutete Mechanismen	Referenz
Ginkgo Biloba (EGb 761)	<ul style="list-style-type: none"> • Lebensverlängerung • Erhöhte thermische & oxidative Stressresistenz in N2 & <i>mev-1</i>-Mutanten • Reduzierte ROS-Akkumulation, <i>gst-4</i>-Promoter-Aktivität & Katalase-Transkription • Reduktion von altersbedingtem Rückgang der Bewegung, der Pharynx-Pumpfrequenz & der Muskelzellen • Unterdrückung der Hitzeschock-induzierten <i>hsp-16.2</i>-Expression 	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidative Eigenschaften • Verringerung von intrazellulärem Stress 	Wu et al., 2002; Strayer et al., 2003; Cao et al., 2007; Kampkötter et al., 2007c
Huminstoffe	<ul style="list-style-type: none"> • Lebensverlängerung in niedrigen Konzentrationen • Regulation von Stressabwehr-relevanten Genen • Erhöhte Attraktion • Leichte Reduktion der Reproduktion 	<ul style="list-style-type: none"> • Hormesis • Modulation des Stressabwehr-systems und der Biotransformation • Antioxidative Kapazitäten 	Menzel et al., 2005; Steinberg et al., 2007
Kaempferol	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte Hitzeresistenz • Verringerte ROS-Akkumulation unter Hitzestress • Reduzierte Lipofuscin-Autofluoreszenz • Translokation von DAF-16 in den Nukleus 	<ul style="list-style-type: none"> • Modulation der DAF-16-Aktivität • Antioxidative Kapazitäten 	Kampkötter et al., 2007a
Kaffeensäure	<ul style="list-style-type: none"> • Lebensverlängerung & thermische Stressresistenz in N2 & in <i>age-1</i>, <i>daf-2</i> & <i>mev-1</i>-Mutanten • Lebensverlängerung bei Verwendung toter Bakterien • Keine Lebensverlängerung und keine erhöhte thermische Stressresistenz in <i>daf-16</i>, <i>osr-1</i>, <i>sek-1</i>, <i>sir-2.1</i> & <i>unc-43</i>-Mutanten • Unveränderte Sensitivität gegenüber Paraquat • Erhöhte antioxidative Wirkung wasserlöslicher, aber nicht lipidlöslicher, Metabolite im Homogenat • Keine signifikanten Auswirkungen auf Reproduktion und Attraktion • Erhöhte Pharynx-Pumpfrequenz 	<ul style="list-style-type: none"> • OSR-1/UNC-43/SEK-1-Signalweg • Regulation von DAF-16 & SIR-2.1 	Pietsch et al., 2010; Pietsch et al., unveröffentlicht

Fortsetzung Tabelle 14

Substanz	Beobachtungen in <i>C. elegans</i> bei Substanz-Exposition	Vermutete Mechanismen	Referenz
Quercetin	<ul style="list-style-type: none"> • Verbesserte Resistenz gegen oxidativen & thermischen Stress • Lebensverlängerung in N2 & <i>akt-2</i>, <i>daf-12</i>, <i>daf-16</i>, <i>jnk-1</i>, <i>mev-1</i>, <i>nhr-8</i>, <i>osr-1</i>, <i>sir-2.1</i> & <i>skn-1</i>-Mutanten • Keine Lebensverlängerung und Stressresistenz in <i>age-1</i>, <i>daf-2</i>, <i>sek-1</i> & <i>unc-43</i>-Mutanten • Kein Effekt auf Reproduktion oder Körperlänge • Erhöhte antioxidative Wirkung wasserlöslicher, aber nicht lipidlöslicher, Metabolite im Homogenat • Erhöhte Pharynx-Pumpfrequenz • Lebensverkürzung in höheren Konzentrationen 	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidative Mechanismen • UNC-43/SEK-1-Signalweg • Hormesis • Keine Beteiligung von DAF-16 	Saul et al., 2008; Pietsch et al., 2009; Pietsch et al., unveröffentlicht
	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte thermische & oxidative Stressresistenz • Reduktion der <i>sod-3</i>-Expression & der Lipofuscin-Akkumulation • Verringerte ROS-Bildung bei thermischem Stress • Reduktion der <i>gst-4</i>-Promoter-Induktion bei Juglon-Exposition • Translokation von DAF-16 in den Nukleus 	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidative Mechanismen • Modulation der DAF-16-Aktivität 	Kampkötter et al., 2007b, 2008
Resveratrol	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte Lebensdauer in N2 & <i>daf-16</i>-Mutanten • Keine Lebensverlängerung in <i>sir-2.1</i>-Mutanten • Stimulierte Deacetylase-Aktivität von SIR-2.1 • Induzierte Expression von <i>cyp-13A6</i> & von mehreren <i>abu</i> & <i>pqn</i>-Genen • Keine Lebensverlängerung im <i>abu-11</i> RNAi-Assay 	<ul style="list-style-type: none"> • Modulation der Stressantwort via SIR-2.1 & ABU-11 	Wood et al., 2004; Viswanathan et al., 2005
	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte Lebensdauer & oxidative Stressresistenz • Veränderung des Reproduktionsmusters, aber nicht der Gesamt-Nachkommenzahl • Keine Veränderung der Pharynx-Pumpfrequenz oder Körperlänge 	<ul style="list-style-type: none"> • Verspäteter Beginn der exponentiellen Erhöhung der Mortalität 	Gruber et al., 2007
	<ul style="list-style-type: none"> • Variable Lebensverlängerung in N2 & <i>sir-2.1</i>-Mutanten 	<ul style="list-style-type: none"> • SIR-2.1-unabhängige Aktivierung der Phase 2-Detoxifikation • AMP-Kinase-Aktivierung 	Bass et al., 2007

Fortsetzung Tabelle 14

Substanz	Beobachtungen in <i>C. elegans</i> bei Substanz-Exposition	Vermutete Mechanismen	Referenz
Rosmarinsäure	<ul style="list-style-type: none"> • Lebensverlängerung (in niederen Dosen) in N2 & in <i>age-1</i>, <i>daf-2</i>, <i>daf-16</i> & <i>mev-1</i>-Mutanten • Toxisch in höherer Konzentration • Lebensverlängerung bei Verwendung toter Bakterien • Keine Lebensverlängerung und erhöhte thermische Stressresistenz in <i>osr-1</i>, <i>sek-1</i>, <i>sir-2.1</i> & <i>unc-43</i>-Mutanten • Erhöht Sensitivität gegenüber Paraquat • Erhöhte thermische Resistenz • Keine signifikante Veränderung der antioxidativen Kapazität im Homogenat • Verzögerte Reproduktion, unveränderte Gesamtproduktion • Erhöhte Pharynx-Pumpfrequenz • Keine signifikante Veränderung der Attraktion 	<ul style="list-style-type: none"> • OSR-1/UNC-43/SEK-1-Signalweg • Hormesis • Regulation von SIR-2.1 	Pietsch et al., unveröffentlicht
<i>R. rosea</i> & <i>E. senticosus</i> Extrakte	<ul style="list-style-type: none"> • Lebensverlängerung in niederen und Lebensverkürzung in höheren Dosen • Verbesserter Schutz gegen UV-Strahlen und Hitze • Erhöhte Resistenz gegen Paraquat durch <i>E. senticosus</i>, nicht durch <i>R. rosea</i> • Lebensverlängerung in <i>mev-1</i>-Mutanten durch <i>E. senticosus</i>, nicht durch <i>R. rosea</i> • DAF-16-Translokation • Aktivierung des <i>hsp-16.2</i>-Promotors 	<ul style="list-style-type: none"> • DAF-16-Aktivierung • Antioxidative & prooxidative Mechanismen • Hormesis 	Wiegant et al., 2009
Rutin	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Erhöhung der Hitzeresistenz • Reduktion von generierten ROS bei thermischem Stress • Reduzierte Induktion des <i>gst-4</i>-Promotors unter Juglon-Exposition • Keine DAF-16-Translokation • Keine veränderte Lipofuscin-Akkumulation 		Kampkötter et al., 2007b
Tocopherol	<ul style="list-style-type: none"> • Lebensverlängerung mit γ-Tocopherol, aber nicht mit α-Tocopherol 		Adachi & Ishii, 2000; Zou et al., 2007
Tocotrienol	<ul style="list-style-type: none"> • Lebensverlängerung • Verbesserte UVB-Stressresistenz 	<ul style="list-style-type: none"> • Verringerung ROS-vermittelter Schäden 	Adachi & Ishii, 2000

Fortsetzung Tabelle 14

Substanz	Beobachtungen in <i>C. elegans</i> bei Substanz-Exposition	Vermutete Mechanismen	Referenz
Vitamin E	<ul style="list-style-type: none"> • Lebensverlängerung • Verringerte & verzögerte Reproduktion • Keine Lebensverlängerung in <i>mev-1</i>-Mutanten • Keine Modulation der mitochondrialen Superoxidanion-Produktion in N2 & <i>mev-1</i>-Mutanten 	<ul style="list-style-type: none"> • Verlangsamung der Reproduktion & Entwicklung 	Harrington & Harley, 1988; Ishii et al., 2004
Wisconsin Ginseng	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Lebensverlängerung • Reduzierung von altersbedingtem Rückgang der Bewegung, der Pharynx-Pumpfrequenz & der Muskelzellen 		Cao et al., 2007

4.7 Kritische Betrachtung, Relevanz und Ausblick

Wie zuverlässig sind die erhaltenen Ergebnisse dieser Arbeit? Bass et al. (2007) zeigten eindrucksvoll am Beispiel von Resveratrol, wie wenig reproduzierbar die Forschungsergebnisse anderer Laboratorien waren. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls überprüft. Der von Wood et al. (2004), Viswanathan et al. (2005) und Gruber et al. (2007) beschriebene lebensverlängernde Effekt von Resveratrol konnte ebenfalls nicht bestätigt werden (Daten nicht aufgeführt). Dies liegt vermutlich nicht an dem Unvermögen der Forschungsgruppen, sondern an der unterschiedlichen Ausstattung der Labore, der Herkunft der verwendeten Medien, Chemikalien und Versuchstiere als auch an Abweichungen der Versuchsdurchführung. So könnte die häufig durchgeführte Synchronisation mittels Hypochlorit bereits einen Stress auslösen, der den Ausgang des Experiments verändert. Temperaturschwankungen in nicht klimatisierten Laboren könnten zu unerwünschtem Hitzestress führen und eine nicht erkannte Kontamination der Futterbakterien kann bereits die Lebensdauer von *C. elegans* beeinflussen. Die Liste der möglichen Fehlerquellen ist lang. Um diesem Einwand zu begegnen sind Wiederholungen in anderen Laboratorien und von anderen Forschungsgruppen notwendig. Erst bei übereinstimmenden Ergebnissen liegt eine verlässliche und reproduzierbare Aussage vor.

Eine weitere Schwierigkeit besteht bei der Interpretation der Ergebnisse. Zunächst lassen die Versuche mit den verschiedenen Mutantenstämmen auch alternative Interpretationsmöglichkeiten zu. Wird ein Gen ausgeschaltet und die Substanz bleibt wirkungslos, erscheint eine Beteiligung des Gens an der in Wildtypen ausgelösten Lebensverlängerung einleuchtend. Möglich ist aber auch, dass durch die Gen-

Ausschaltung die Aufnahme der Substanz verhindert wird oder deren Abbau beschleunigt wird. *Mev-1* bietet da ein weiteres und bekanntes Beispiel. Diese Mutante weist erhöhten oxidativen Stress auf, so dass ein leicht prooxidativ-wirkender Stoff vermutlich keine positiven Auswirkungen auf diese Tiere haben wird. Das bedeutet jedoch nicht, dass MEV-1 relevant für den Wirkweg der Substanz ist. Zu wenig ist noch bekannt über die Auswirkungen und Wechselwirkungen der einzelnen Proteine, als dass diese oder ähnliche Effekte ausgeschlossen werden könnten. Ebenso ist eine Lebensverlängerung in einer Mutante nicht gleichbedeutend mit einer Irrelevanz des Gens an der Lebensverlängerung. Die Wirkung des fehlenden Proteins kann zum Beispiel durch ein anderes ausgeglichen werden, so dass nur die kombinierte Eliminierung beider Proteine zu einer Neutralisierung der Langlebigkeit führen würde. Auch ist es möglich, dass zwei individuelle Prozesse zur Langlebigkeit führen. Das Fehlen eines der Prozesse könnte durch die Aktivität des anderen maskiert werden.

Die Genexpressionsanalyse offenbart weitere Kritikpunkte. Obwohl das Expressionsmuster vieler Tausend Gene einen Einblick in die Wirkprinzipien erlaubt, so kann die Untersuchung allein jedoch nur Indizien liefern. Dies liegt an den vielfältigen Möglichkeiten der molekularen Regulation. So ist nicht nur entscheidend, wie oft ein Gen abgelesen wird, sondern auch, wie stabil die entstandene mRNA ist und ob und wie alternatives Spleißen das Genprodukt beeinflusst. Selbst wenn es aufgrund einer erhöhten Expression zu einer erhöhten Proteinmenge kommt, so spielen hier die korrekte Proteinfaltung, diverse posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen oder Methylierungen, als auch das Vorhandensein spezieller Cofaktoren eine entscheidende Rolle. Eine verringerte Genexpression könnte sogar ein Indiz für ein erhöhtes Protein-Aufkommen sein, wenn das Protein durch Rückkopplung der Regulation seiner eigenen Expression befähigt ist. Eine Induktion oder Repression eines Gens lässt also nicht zwangsläufig auf das Vorkommen oder die Aktivität des Genproduktes schließen. Zudem zeigen neueste Forschungen die Relevanz von kleinen, nicht-kodierenden RNAs, wie die Mikro-RNAs, auch an den Prozessen der Langlebigkeit auf (Grillari & Grillari-Voglauer, 2010). Diese RNAs werden aber bei dem durchgeführten Microarray nicht berücksichtigt. Auch epigenetische Veränderungen an der DNA können mit dieser Methode nicht charakterisiert werden. Zur eindeutigen Analyse sind daher weitere Untersuchungen wie die Proteomanalyse, Enzymaktivitäts-Analysen als auch Mikro-RNA-Expressionsanalysen notwendig.

Zuletzt besteht die Schwierigkeit, die erhaltenen Ergebnisse in den richtigen Kontext einzuordnen. Eine veränderte Genexpression könnte Folge der Langlebigkeit oder deren Ursache sein oder nur als Lebensdauer-irrelevanter Nebeneffekt der Substanzexposition entstehen. Dies gilt auch für diverse, beobachtete Lebensparameter wie das Wachstum, die Reproduktion, die Stressresistenz, die Fettakkumulation oder die Pharynx-Pumpfrequenz. Die Einordnung liegt letztlich

im Ermessen des Untersuchers. Zur Abrundung der Ergebnisse wäre schließlich auch der metabolische Status der Tiere von Vorteil. So ist derzeit nicht klar, ob die Tannine in der zugeführten Form wirken oder ob sie Metabolisierungsprozessen unterworfen sind, die erst das eigentlich wirksame Molekül hervorbringen. Interessant in diesem Zusammenhang ist auch die Metabolisierungs-Kinetik, die bestimmt, wie lange die Tanninmoleküle unverändert im Tier, in den Futterbakterien und auch im Medium verbleiben.

Zur besseren Beschreibung der Tanninwirkung gibt es darüber hinaus noch zahlreiche, zusätzliche Möglichkeiten. Weitere Mutantenstämme von im Microarray auffälligen Genen könnten im Lebensdauertest überprüft werden. Sind keine Mutantenstämme vorhanden, so könnte die Abschaltung dieser Gene via RNAi (RNA-Interferenz) durchgeführt werden. Die Durchführung von Microarrays für die anderen Tannine würde zudem eine viel bessere Vergleichsmöglichkeit bieten. Die Untersuchung weiterer Tannine würde vielleicht einen Hinweis auf die strukturelle Voraussetzung zur lebensverlängernden Wirkweise geben. Natürlich ist die Analyse der Tannine in weiteren Stresstests mit anderen Stressoren sinnvoll. Dies würde einen guten Einblick in die Wirkungsweise geben.

Trotz dieser Unzulänglichkeiten und noch ausstehenden Untersuchungsmöglichkeiten kann diese Arbeit einen wesentlichen Bestandteil zur Erforschung der Tanninwirkung und zum Verständnis des Alterns beitragen. Um die Relevanz und die Anwendungsbereiche dieser Arbeit darzustellen, sollen einige Beispiele herangezogen werden:

Nach Überprüfung der hier identifizierten Wirkwege in weiteren Versuchstieren als auch in humanen Zellkulturen, könnten sich pharmakologische Ansatzpunkte herauskristallisieren, die gezieltes Kreieren von Wirkstoffen ermöglichen, welche schließlich auch eine Langlebigkeit oder ein verringertes Auftreten altersbedingter Erkrankungen im Menschen hervorrufen könnten. Die Komplexität des Menschen lässt erahnen, dass dies noch ein sehr langer Weg ist. Natürlich ist in diesem Zusammenhang auch fraglich, ob Langlebigkeit wirtschaftlich, gesellschaftlich und bezüglich der Lebensqualität im Alter überhaupt sinnvoll und wünschenswert ist. Unter Beachtung der Tatsache, dass ein Großteil der Menschen auf dieser Welt nicht aufgrund von Altersschwäche stirbt, sondern durch Unterversorgung, Seuchen oder Gewalt, erscheint dieses Ziel auch ethisch hinterfragenswert.

Die molekularbiologische Forschung könnte von dieser Untersuchung ebenfalls profitieren. Das postulierte Zusammenspiel einiger in dieser Arbeit aufgezeigter Proteine könnte die Basis für eine detailliertere Untersuchung der Proteine und ihrer Wechselwirkungen sein. So könnten neue Signalwege in *C. elegans* identifiziert werden, die zum Verständnis der sehr komplexen, molekularen Interaktionen beitragen würden. Ebenso bietet sich die Möglichkeit, den Hormesis-Effekt molekular zu verstehen, indem Vergleiche mit anderen hormetisch wirksamen Substanzen auf molekularer Ebene vorgenommen werden.

Der Einfluss auf die ökologische Forschung bestünde unter anderem in der Neubewertung von pflanzlichen Tanninen. Ihre lebensverlängernde Wirkung als auch die verschiedenen negativen Eigenschaften können sich auf die Populationsdynamik auswirken. Verschiedene Modelle könnten entworfen werden, um die Tanninauswirkung im ökologischen Kontext zu begreifen. Ein Interspezies-Vergleich könnte zudem Anhaltspunkte für die Begründung der Besiedelung bestimmter ökologischer Nischen geben und evolutionsbiologische Antworten liefern.

Diese Studie bietet zudem ein weiteres Argument für den Anbau und Verzehr von pflanzlicher Nahrung in „Bio“-Qualität. Da Polyphenole und Tannine häufig zur pathogenen Stressabwehr in Pflanzen produziert werden, könnte die Abtötung der Pathogene durch Pestizide den Polyphenol-Gehalt verringern. Weitere Studien sollten durchgeführt werden, um den Polyphenol- und auch spezifisch den Tanningehalt von Bio-Produkten und konventionellen Produkten zu ermitteln und zu vergleichen. Die positiven Wirkungen der Tannine sollten hierfür aber auch im Menschen überprüft werden.

Diese Arbeit erfüllt weniger den Zweck, endgültige Antworten zu liefern, da dies aufgrund der Komplexität der involvierten Themengebiete kaum möglich ist. Vielmehr soll sie erste Indizien hervorbringen, welche verschiedene Forschungsgruppen motivieren soll, in dieser Richtung weiter zu arbeiten. Aus vielen Puzzleteilen wird letztendlich ein Gesamtbild resultieren, so dass der Alterungsprozess und die Tanninwirkung eines Tages endgültig entschlüsselt und die Resultate sinnvoll genutzt werden können.

5 Literaturverzeichnis

- Abbas S, Wink M (2009) Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med.* 75, 216–221.
- Adachi H, Ishii N (2000) Effects of tocotrienols on life span and protein carbonylation in *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 55, B280–B285.
- Ahmed S, Rahman A, Saleem M, Athar M, Sultana S (1999) Ellagic acid ameliorates nickel induced biochemical alterations: diminution of oxidative stress. *Hum Exp Toxicol.* 18, 691–698.
- Akagawa M, Shigemitsu T, Suyama K (2003) Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67, 2632–2640.
- Albin RL (1993) Antagonistic pleiotropy, mutation accumulation, and human genetic disease. *Genetica.* 91, 279–286.
- Alcedo J, Kenyon C (2004) Regulation of *C. elegans* longevity by specific gustatory and olfactory neurons. *Neuron.* 41, 45–55.
- Alexeyev MF (2009) Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species? *FEBS J.* 276, 5768–5787.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90, 7915–7922.
- Andrade RG Jr, Dalvi LT, Silva JM Jr, Lopes GK, Alonso A, Hermes-Lima M (2005) The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals. *Arch Biochem Biophys.* 437, 1–9.
- Andrade RG Jr, Ginani JS, Lopes GK, Dutra F, Alonso A, Hermes-Lima M (2006) Tannic acid inhibits in vitro iron-dependent free radical formation. *Biochimie.* 88, 1287–1296.
- Arantes-Oliveira N, Apfeld J, Dillin A, Kenyon C (2002) Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 295, 502–505.
- Arendt JD (1997) Adaptive intrinsic growth rates: an integration across taxa. *Q Rev Biol.* 72, 149–177.
- Arhelger RB, Broom JS, Boler RK (1965) Ultrastructural hepatic alterations following tannic acid administration to rabbits. *Am J Pathol.* 46, 409–434.

- Ariga T (2004) The antioxidative function, preventive action on disease and utilization of proanthocyanidins. *Biofactors*. 21, 197-201.
- Arts IC (2008) A review of the epidemiological evidence on tea, flavonoids, and lung cancer. *J Nutr*. 138, 1561S-1566S.
- Aruoma OI (2003) Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat Res*. 523-524, 9-20.
- Bais HP, Walker TS, Stermitz FR, Hufbauer RA, Vivanco JM (2002) Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (+/-)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. *Plant Physiol*. 128, 1173-1179.
- Ban JY, Nguyen HT, Lee HJ, Cho SO, Ju HS, Kim JY, Bae K, Song KS, Seong YH (2008) Neuroprotective properties of gallic acid from *Sanguisorbae radix* on amyloid beta protein (25--35)-induced toxicity in cultured rat cortical neurons. *Biol Pharm Bull*. 31, 149-153.
- Bass TM, Weinkove D, Houthoofd K, Gems D, Partridge L (2007) Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev*. 128, 546-552.
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 444, 337-342.
- Bell C, Hawthorne S (2008) Ellagic acid, pomegranate and prostate cancer -- a mini review. *J Pharm Pharmacol*. 60, 139-144.
- Benedetti MG, Foster AL, Vantipalli MC, White MP, Sampayo JN, Gill MS, Olsen A, Lithgow GJ (2008) Compounds that confer thermal stress resistance and extended lifespan. *Exp Gerontol*. 43, 882-891.
- Bennet RN, Wallsgrove RM (1994) Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol*. 127, 617-633.
- Berdichevsky A, Guarente L (2006) A stress response pathway involving sirtuins, forkheads and 14-3-3 proteins. *Cell Cycle*. 5, 2588-2591.
- Berdichevsky A, Viswanathan M, Horvitz HR, Guarente L (2006) *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell*. 125, 1165-1177.

- Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C (2007) Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 297, 842-857.
- Blagosklonny MV (2007) Paradoxes of aging. *Cell Cycle*. 6, 2997-3003.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 37, 911-917.
- Blüher M, Kahn BB, Kahn CR (2003) Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science*. 299, 572-574.
- Bonfili L, Cecarini V, Amici M, Cuccioloni M, Angeletti M, Keller JN, Eleuteri AM (2008) Natural polyphenols as proteasome modulators and their role as anti-cancer compounds. *FEBS J*. 275, 5512-5526.
- Boyd WA, Crocker TL, Rodriguez AM, Leung MC, Lehmann DW, Freedman JH, Van Houten B, Meyer JN (2010) Nucleotide excision repair genes are expressed at low levels and are not detectably inducible in *Caenorhabditis elegans* somatic tissues, but their function is required for normal adult life after UVC exposure. *Mutat Res*. 683, 57-67.
- Braeckman BP, Vanfleteren JR (2007) Genetic control of longevity in *C. elegans*. *Exp Gerontol*. 42, 90-98.
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 77, 71-94.
- Brown MK, Evans JL, Luo Y (2006) Beneficial effects of natural antioxidants EGCG and alpha-lipoic acid on life span and age-dependent behavioral declines in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacol Biochem Behav*. 85, 620-628.
- Brys K, Vanfleteren JR, Braeckman BP (2007) Testing the rate-of-living/oxidative damage theory of aging in the nematode model *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*. 42, 845-851.
- Buenger J, Ackermann H, Jentsch A, Mehling A, Pfitzner I, Reiffen KA, Schroeder KR, Wollenweber U (2006) An interlaboratory comparison of methods used to assess antioxidant potentials. *Int J Cosmet Sci*. 28, 135-146.
- Butler LG (1992) Antinutritional effects of condensed and hydrolyzable tannins. *Basic Life Sci*. 59, 693-698.
- Buzzini P, Arapitsas P, Goretti M, Branda E, Turchetti B, Pinelli P, Ieri F, Romani A (2008) Antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannins. *Mini Rev Med Chem*. 8, 1179-1187.

- Calabrese EJ (2008) Converging concepts: adaptive response, preconditioning, and the Yerkes-Dodson Law are manifestations of hormesis. *Ageing Res Rev.* 7, 8-20.
- Calabrese EJ, Baldwin LA (2001a) The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literature. *Toxicol Sci.* 62, 330-338.
- Calabrese EJ, Baldwin LA (2001b) U-shaped dose-responses in biology, toxicology, and public health. *Annu Rev Public Health.* 22, 15-33.
- Calabrese EJ, Baldwin LA (2003) Chemotherapeutics and hormesis. *Crit Rev Toxicol.* 33, 305-353.
- Calabrese EJ, Baldwin LA, Holland CD (1999) Hormesis: a highly generalizable and reproducible phenomenon with important implications for risk assessment. *Risk Anal.* 19, 261-281.
- Calabrese EJ, McCarthy ME, Kenyon E (1987) The occurrence of chemically induced hormesis. *Health Phys.* 52, 531-541.
- Cao Z, Wu Y, Curry K, Wu Z, Christen Y, Luo Y (2007) Ginkgo biloba extract EGb 761 and Wisconsin Ginseng delay sarcopenia in *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 62, 1337-1345.
- Carbonaro M, Grant G, Pusztai A (2001) Evaluation of polyphenol bioavailability in rat small intestine. *Eur J Nutr.* 40, 84-90.
- Carmona A (1996) Tannins: thermostable pigments which complex dietary proteins and inhibit digestive enzymes. *Arch Latinoam Nutr.* 44, 31S-35S.
- Castelein N, Hoogewijs D, De Vreese A, Braeckman BP, Vanfleteren JR (2008) Dietary restriction by growth in axenic medium induces discrete changes in the transcriptional output of genes involved in energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Biotechnol J.* 3, 803-812.
- Chao CY, Mong MC, Chan KC, Yin MC (2010) Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice. *Mol Nutr Food Res.* 54, 388-395.
- Chapman PM (2001) The implications of hormesis to ecotoxicology and ecological risk assessment. *Hum Exp Toxicol.* 20, 499-505.
- Chen KS, Hsiao YC, Kuo DY, Chou MC, Chu SC, Hsieh YS, Lin TH (2009) Tannic acid-induced apoptosis and -enhanced sensitivity to arsenic trioxide in human leukemia HL-60 cells. *Leuk Res.* 33, 297-307.

- Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, Berenshtein E, Stadtman ER, Epstein Y (2003) Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100, 5119-5123.
- Chobot V, Hadacek F (2009) Milieu-dependent pro- and antioxidant activity of juglone may explain linear and nonlinear effects on seedling development. *J Chem Ecol*. 35, 383-390.
- Chung KT, Lu Z, Chou MW (1998a) Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food Chem Toxicol*. 36, 1053-1060.
- Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y (1998b) Tannins and human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 38, 421-464.
- Chung-MacCoubrey AL, Hagerman AE, Kirkpatrick RL (1997) Effects of tannins on digestion and detoxification activity in gray squirrels (*Sciurus carolinensis*). *Physiol Zool*. 70, 270-277.
- Collins JJ, Evason K, Kornfeld K (2006) Pharmacology of delayed aging and extended lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*. 41, 1032-1039.
- Cooper TM, Mockett RJ, Sohal BH, Sohal RS, Orr WC (2004) Effect of caloric restriction on life span of the housefly, *Musca domestica*. *FASEB J*. 18, 1591-1593.
- Crespy V, Williamson G (2004) A review of the health effects of green tea catechins in *in vivo* animal models. *J Nutr*. 134, 3431S-3440S.
- Cui Y, McBride SJ, Boyd WA, Alper S, Freedman JH (2007) Toxicogenomic analysis of *Caenorhabditis elegans* reveals novel genes and pathways involved in the resistance to cadmium toxicity. *Genome Biol*. 8, R122.
- Curran SP, Ruvkun G (2007) Lifespan regulation by evolutionarily conserved genes essential for viability. *PLoS Genet*. 3, e56.
- Custodia N, Won SJ, Novillo A, Wieland M, Li C, Callard IP (2001) *Caenorhabditis elegans* as an environmental monitor using DNA microarray analysis. *Ann N Y Acad Sci*. 948, 32-42.
- Cypser JR, Johnson TE (2002) Multiple stressors in *Caenorhabditis elegans* induce stress hormesis and extended longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 57, B109-B114.
- Cypser JR, Tedesco P, Johnson TE (2006) Hormesis and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*. 41, 935-939.

- Dani C, Bonatto D, Salvador M, Pereira MD, Henriques JA, Eleutherio E (2008) Antioxidant protection of resveratrol and catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem.* 56, 4268–4272.
- Davies J, Spiegelman GB, Yim G (2006) The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol.* 9, 445–453.
- De Nicola E, Gallo M, Iaccarino M, Meriç S, Oral R, Russo T, Sorrentino T, Tünay O, Vuttariello E, Warnau M, Pagano G (2004) Hormetic versus toxic effects of vegetable tannin in a multitest study. *Arch Environ Contam Toxicol.* 46, 336–344.
- De Nicola E, Meriç S, Gallo M, Iaccarino M, Della Rocca C, Lofrano G, Russo T, Pagano G (2007) Vegetable and synthetic tannins induce hormesis/toxicity in sea urchin early development and in algal growth. *Environ Pollut.* 146, 46–54.
- Deocaris CC, Taira K, Kaul SC, Wadhwa R (2005) Mimotope-hormesis and mortalin/grp75/mthsp70: a new hypothesis on how infectious disease-associated epitope mimicry may explain low cancer burden in developing nations. *FEBS Lett.* 579, 586–590.
- Dirks AJ, Leeuwenburgh C (2006) Caloric restriction in humans: potential pitfalls and health concerns. *Mech Ageing Dev.* 127, 1–7.
- Doonan R, McElwee JJ, Matthijssens F, Walker G, Back P, Vanfleteren J, Gems D. (2008a) Disparate effects of the five *C. elegans* superoxide dismutases on dauer formation, stress resistance and aging. *C. elegans Aging, Stress, Pathogenesis, and Heterochrony Meeting*. WBPaper00032649, <http://www.wormbase.org>.
- Doonan R, McElwee JJ, Matthijssens F, Walker GA, Houthoofd K, Back P, Matscheski A, Vanfleteren JR, Gems D (2008b) Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 22, 3236–3241.
- Douglas H (2008) Science, hormesis and regulation. *Hum Exp Toxicol.* 27, 603–607.
- Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82, 47–95.
- Duthie SJ (2007) Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process. *Mol Nutr Food Res.* 51, 665–674.
- Duthie GG, Gardner PT, Kyle JA (2003) Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc Nutr Soc.* 62, 599–603.
- Feng R, He W, Ochi H (2001) A new murine oxidative stress model associated with senescence. *Mech Ageing Dev.* 122, 547–559.

- Ferbeyre G, Lowe SW (2002) The price of tumour suppression? *Nature*. 415, 26-27.
- Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R (2009) Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*. 460, 587-591.
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408, 239-247.
- Fisher ND, Hollenberg NK (2005) Flavanols for cardiovascular health: the science behind the sweetness. *J Hypertens*. 23, 1453-1459.
- Fisher AL, Lithgow GJ (2006) The nuclear hormone receptor DAF-12 has opposing effects on *Caenorhabditis elegans* lifespan and regulates genes repressed in multiple long-lived worms. *Aging Cell*. 5, 127-138.
- Forster MJ, Morris P, Sohal RS (2003) Genotype and age influence the effect of caloric intake on mortality in mice. *FASEB J*. 17, 690-692.
- Frei B, Higdon JV (2003) Antioxidant activity of tea polyphenols *in vivo*: evidence from animal studies. *J Nutr*. 133, 3275S-3284S.
- Fukushima S, Kinoshita A, Puatanachokchai R, Kushida M, Wanibuchi H, Morimura K (2005) Hormesis and dose-response-mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis*. 26, 1835-1845.
- Galati G, Lin A, Sultan AM, O'Brien PJ (2006) Cellular and *in vivo* hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radical Biol Med*. 40, 570-580.
- Gann PH, Hennekens CH, Ma J, Longcope C, Stampfer MJ (1996) Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 88, 1118-1126.
- Garigan D, Hsu AL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Kenyon C (2002) Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics*. 161, 1101-1112.
- Gebhardt-Henrich S, Richner H (1998) Causes of growth variation and its consequences for fitness. In: *Avian growth and development: evolution within the altricial-precocial spectrum*. Eds.: J. Starck, R. Ricklefs, Oxford University Press, New York, 324-339.
- Gems D, Doonan R (2009) Antioxidant defense and aging in *C. elegans*: is the oxidative damage theory of aging wrong? *Cell Cycle*. 8, 1681-1687.

- Gems D, McElwee JJ (2005) Broad spectrum detoxification: the major longevity assurance process regulated by insulin/IGF-1 signaling? *Mech Ageing Dev.* 126, 381-387.
- Gems D, Partridge L (2008) Stress-response hormesis and aging: "that which does not kill us makes us stronger". *Cell Metab.* 7, 200-203.
- Gems D, Sutton AJ, Sundermeyer ML, Albert PS, King KV, Edgley ML, Larsen PL, Riddle DL (1998) Two pleiotropic classes of daf-2 mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 150, 129-155.
- Gershon H, Gershon D (2000) The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review. *Mech Ageing Dev.* 120, 1-22.
- Gershon H, Gershon D (2002) *Caenorhabditis elegans*--a paradigm for aging research: advantages and limitations. *Mech Ageing Dev.* 123, 261-274.
- Giftson JS, Jayanthi S, Nalini N (2009) Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Invest New Drugs.* 28, 251-259.
- Girolami A (1967) The action of ellagic acid on the coagulation mechanism and experimental and clinical bleeding. *Haematol Lat.* 10, 291-301.
- Girolami A, Cliffton EE (1967) Hypercoagulable state induced in humans by the intravenous administration of purified ellagic acid. *Thromb Diath Haemorrh.* 17, 165-175.
- Greer EL, Banko MR, Brunet A (2009) AMP-activated protein kinase and FoxO transcription factors in dietary restriction-induced longevity. *Ann N Y Acad Sci.* 1170, 688-692.
- Greer EL, Brunet A (2009) Different dietary restriction regimens extend lifespan by both independent and overlapping genetic pathways in *C. elegans*. *Aging Cell.* 8, 113-127.
- Grillari J, Grillari-Voglauer R (2010) Novel modulators of senescence, aging, and longevity: Small non-coding RNAs enter the stage. *Exp Gerontol.* 45, 302-311.
- Gruber J, Tang SY, Halliwell B (2007) Evidence for a trade-off between survival and fitness caused by resveratrol treatment of *Caenorhabditis elegans*. *Ann NY Acad Sci.* 1100, 530-542.
- Guarente L (2008) Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell.* 132, 171-176.

- GuhaThakurta D, Palomar L, Stormo GD, Tedesco P, Johnson TE, Walker DW, Lithgow G, Kim S, Link CD (2002) Identification of a novel cis-regulatory element involved in the heat shock response in *Caenorhabditis elegans* using microarray gene expression and computational methods. *Genome Res.* 12, 701-712.
- Haag ES, Chamberlin H, Coghlan A, Fitch DH, Peters AD, Schulenburg H (2007) *Caenorhabditis* evolution: if they all look alike, you aren't looking hard enough. *Trends Genet.* 23, 101-104.
- Hagerman AE (2002) The tannin handbook. <http://www.users.muohio.edu/hagermae/>.
- Hajna AA, Perry CA (1939) Optimum temperature for differentiation of *Escherichia coli* from other coliform bacteria. *J Bacteriol.* 38, 275-283.
- Hamilton B, Dong Y, Shindo M, Liu W, Odell I, Ruvkun G, Lee SS (2005) A systematic RNAi screen for longevity genes in *C. elegans*. *Genes Dev.* 19, 1544-1555.
- Hancock V, Dahl M, Vejborg RM, Klemm P (2010) Dietary plant components ellagic acid and tannic acid inhibit *Escherichia coli* biofilm formation. *J Med Microbiol.* 59, 496-498.
- Harley CB (1997) Human ageing and telomeres. *Ciba Found Symp.* 211, 129-139.
- Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11, 298-300.
- Harman D (1972) The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc.* 20, 145-147.
- Harrington LA, Harley CB (1988) Effect of vitamin E on lifespan and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev.* 43, 71-78.
- Hartwig K, Heidler T, Moch J, Daniel H, Wenzel U (2009) Feeding a ROS-generator to *Caenorhabditis elegans* leads to increased expression of small heat shock protein HSP-16.2 and hormesis. *Genes Nutr.* 4, 59-67.
- Hassoun EA, Walter AC, Alsharif NZ, Stohs SJ (1997) Modulation of TCDD-induced fetotoxicity and oxidative stress in embryonic and placental tissues of C57BL/6J mice by vitamin E succinate and ellagic acid. *Toxicology.* 124, 27-37.
- Hayashi H, Yamaza H, Komatsu T, Park S, Chiba T, Higami Y, Nagayasu T, Shimokawa I (2008) Calorie restriction minimizes activation of insulin signaling in response to glucose: potential involvement of the growth hormone-insulin-like growth factor 1 axis. *Exp Gerontol.* 43, 827-832.

- Hazzard DG (1991) Relevance of the rodent model to human aging studies. *Neurobiol Aging*. 12, 645-649.
- Hedgecock EM, Sulston JE, Thomson JN (1983) Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 220, 1277-1279.
- Heilbronn LK, Ravussin E (2003) Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr*. 78, 361-369.
- Helfand SL, Rogina B (2003) From genes to aging in *Drosophila*. *Adv Genet*. 49, 67-109.
- Henderson ST, Johnson TE (2001) daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*. 11, 1975-1980.
- Henning SM, Fajardo-Lira C, Lee HW, Youssefian AA, Go VLW, Heber D (2003) Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity. *Nutr Cancer*. 45, 226-235.
- Higdon JV, Frei B (2003) Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 43, 89-143.
- Hodgkin J, Horvitz HR, Brenner S (1979) Nondisjunction mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 91, 67-94.
- Holliday R (1989) Food, reproduction and longevity: is the extended lifespan of calorie-restricted animals an evolutionary adaptation? *Bioessays*. 10, 125-127.
- Houthoofd K, Braeckman BP, Lenaerts I, Brys K, De Vreese A, Van Eygen S, Vanfleteren JR (2002) No reduction of metabolic rate in food restricted *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*. 37, 1359-1369.
- Houthoofd K, Vanfleteren JR (2006) The longevity effect of dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*. 41, 1026-1031.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 425, 191-196.
- Howitz KT, Sinclair DA (2008) Xenohormesis: sensing the chemical cues of other species. *Cell*. 133, 387-391.
- Hsin H, Kenyon C (1999) Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature*. 399, 362-366.
- Hu PJ (2007) Dauer. In: *WormBook*. Eds.: The *C. elegans* Research Community, doi/10.1895/wormbook.1.144.1, <http://www.wormbook.org>.

- Huang MT, Chang RL, Wood AW, Newmark HL, Sayer JM, Yagi H, Jerina DM, Conney AH (1985) Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by tannic acid, hydroxylated anthraquinones and hydroxylated cinnamic acid derivatives. *Carcinogenesis*. 6, 237-242.
- Huang TH, Peng G, Kota BP, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD, Li Y (2005) Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: activation of PPAR-gamma and identification of an active component. *Toxicol Appl Pharmacol*. 207, 160-169.
- Huang Q, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T (2006) Elevated levels of DNA repair enzymes and antioxidative enzymes by (+)-catechin in murinemic microglia cells after oxidative stress. *J Asian Nat Prod Res*. 8, 61-71.
- Huang C, Xiong C, Kornfeld K (2004) Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101, 8084-8089.
- Hupkens P, Boxma H, Dokter J (1995) Tannic acid as a topical agent in burns: historical considerations and implications for new developments. *Burns*. 21, 57-61.
- Hynes MJ, Coinceanainn MO (2001) The kinetics and mechanisms of the reaction of iron(III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and catechin. *J Inorg Biochem*. 85, 131-142.
- Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, Guarente L (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*. 403, 795-800.
- Inanami O, Watanabe Y, Syuto B, Nakano M, Tsuji M, Kuwabara M (1998) Oral administration of (-)-catechin protects against ischemia-reperfusion-induced neuronal death in the gerbil. *Free Radical Res*. 29, 359-365.
- Ingram DK, Roth GS, Lane MA, Ottinger MA, Zou S, de Cabo R, Mattison JA (2006) The potential for dietary restriction to increase longevity in humans: extrapolation from monkey studies. *Biogerontology*. 7, 143-148.
- Ishii N, Fujii M, Hartman PS, Tsuda M, Yasuda K, Senoo-Matsuda N, Yanase S, Ayusawa D, Suzuki K (1998) A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature*. 394, 694-697.
- Ishii N, Senoo-Matsuda N, Miyake K, Yasuda K, Ishii T, Hartman PS, Furukawa S (2004) Coenzyme Q10 can prolong *C. elegans* lifespan by lowering oxidative stress. *Mech Ageing Dev*. 125, 41-46.

- Isuzugawa K, Inoue M, Ogihara Y (2001) Catalase contents in cells determine sensitivity to the apoptosis inducer gallic acid. *Biol Pharm Bull.* 24, 1022-1026.
- Jannot G, Simard MJ (2006) Tumour-related microRNAs functions in *Caenorhabditis elegans*. *Oncogene.* 25, 6197-6201.
- Jeon SE, Choi-Kwon S, Park KA, Lee HJ, Park MS, Lee JH, Kwon SB, Park KC (2003) Dietary supplementation of (+)-catechin protects against UVB induced skin damage by modulating antioxidant enzyme activities. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 19, 235-241.
- Jia K, Chen D, Riddle DL (2004) The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development.* 131, 3897-3906.
- Johnson TE (2006) For the special issue: the nematode *Caenorhabditis elegans* in aging research. *Exp Gerontol.* 41, 887-889.
- Johnson TE (2008) *Caenorhabditis elegans* 2007: the premier model for the study of aging. *Exp Gerontol.* 43, 1-4.
- Johnson TE, de Castro E, Hegi de Castro S, Cypser J, Henderson S, Tedesco P (2001) Relationship between increased longevity and stress resistance as assessed through gerontogene mutations in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol.* 36, 1609-1617.
- Johnson TE, Hartman PS (1988) Radiation effects on life span in *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol.* 43, B137-B141.
- Johnson TE, Henderson S, Murakami S, de Castro E, de Castro SH, Cypser J, Rikke B, Tedesco P, Link C (2002) Longevity genes in the nematode *Caenorhabditis elegans* also mediate increased resistance to stress and prevent disease. *J Inherit Metab Dis.* 25, 197-206.
- Johnson TE, Lithgow GJ, Murakami S (1996) Hypothesis: interventions that increase the response to stress offer the potential for effective life prolongation and increased health. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 51, B392-B395.
- Jorgensen EM, Mango SE (2002) The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. *Nat Rev Genet.* 3, 356-369.
- Kaeberlein M, Powers RW 3rd, Steffen KK, Westman EA, Hu D, Dang N, Kerr EO, Kirkland KT, Fields S, Kennedy BK (2005) Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science.* 310, 1193-1196.
- Kaeberlein TL, Smith ED, Tsuchiya M, Welton KL, Thomas JH, Fields S, Kennedy BK, Kaeberlein M (2006) Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by complete removal of food. *Aging Cell.* 5, 487-494.

- Kamei H, Koide T, Hashimoto Y, Kojima T, Hasegawa M (1999) Tumor cell growth suppression by tannic acid. *Cancer Biother Radiopharm.* 14, 135-138.
- Kampkötter A, Gombitang Nkwonkam C, Zurawski RF, Timpel C, Chovolou Y, Wätjen W, Kahl R (2007a) Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Arch Toxicol.* 81, 849-858.
- Kampkötter A, Nkwonkam CG, Zurawski RF, Timpel C, Chovolou Y, Wätjen W, Kahl R (2007b) Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology.* 234, 113-123.
- Kampkötter A, Pielarski T, Rohrig R, Timpel C, Chovolou Y, Wätjen W, Kahl R (2007c) The Ginkgo biloba extract EGb 761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacol Res.* 55, 139-147.
- Kampkötter A, Timpel C, Zurawski RF, Ruhl S, Chovolou Y, Proksch P, Wätjen W (2008) Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 149, 314-323.
- Kang MS, Oh JS, Kang IC, Hong SJ, Choi CH (2008) Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. *J Microbiol.* 46, 744-750.
- Kapahi P, Zid BM, Harper T, Koslover D, Sapin V, Benzer S (2004) Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol.* 14, 885-890.
- Katz SR, Newman RA, Lansky EP (2007) *Punica granatum*: heuristic treatment for diabetes mellitus. *J Med Food.* 10, 213-217.
- Kendig EL, Le HH, Belcher SM (2010) Defining hormesis: evaluation of a complex concentration response phenomenon. *Int J Toxicol.* 29, 235-246.
- Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature.* 366, 461-464.
- Khan NS, Ahmad A, Hadi SM (2000) Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. *Chem Biol Interact.* 125, 177-189.
- Khanduja KL, Gandhi RK, Pathania V, Syal N (1999) Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. *Food Chem Toxicol.* 37, 313-318.
- Kharade SV, Mittal N, Das SP, Sinha P, Roy N (2005) Mrg19 depletion increases *S. cerevisiae* lifespan by augmenting ROS defence. *FEBS Lett.* 579, 6809-6813.

- Kim HG, Cho JH, Jeong EY, Lim JH, Lee SH, Lee HS (2006) Growth-inhibiting activity of active component isolated from *Terminalia chebula* fruits against intestinal bacteria. *J Food Prot.* 69, 2205-2209.
- Kim DH, Feinbaum R, Alloing G, Emerson FE, Garsin DA, Inoue H, Tanaka-Hino M, Hisamoto N, Matsumoto K, Tan MW, Ausubel FM (2002) A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science.* 297, 623-626.
- Kim SJ, Han D, Moon KD, Rhee JS (1995) Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants. *Biosci Biotechnol Biochem.* 59, 822-826.
- Kim TJ, Silva JL, Jung YS (2009) Antibacterial activity of fresh and processed red muscadine juice and the role of their polar compounds on *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol.* 107, 533-539.
- Kim Y, Sun H (2007) Functional genomic approach to identify novel genes involved in the regulation of oxidative stress resistance and animal lifespan. *Aging Cell.* 6, 489-503.
- Kiontke K, Sudhaus W (2006) Ecology of *Caenorhabditis* species. In: *WormBook*. Eds.: The C. elegans Research Community, doi/10.1895/wormbook.1.37.1, <http://www.wormbook.org>.
- Kirkwood TB (1977) Evolution of ageing. *Nature.* 270, 301-304.
- Kirkwood TB (1988) The nature and causes of ageing. *Ciba Found. Symp.* 134, 193-207.
- Kirkwood TB, Holliday R (1979) The evolution of ageing and longevity. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 205, 531-546.
- Kirkwood TB, Rose MR (1991) Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 332, 15-24.
- Kitani K, Osawa T, Yokozawa T (2007) The effects of tetrahydrocurcumin and green tea polyphenol on the survival of male C57BL/6 mice. *Biogerontology.* 8, 567-573.
- Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 76, 560-568.
- Kofink M, Papagiannopoulos M, Galensa R (2007) (-)-Catechin in cocoa and chocolate: occurrence and analysis of an atypical flavan-3-ol enantiomer. *Molecules.* 12, 1274-1288.

- Koleckar V, Kubikova K, Rehakova Z, Kuca K, Jun D, Jahodar L, Opletal L (2008) Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. *Mini Rev Med Chem.* 8, 436-447.
- Kondo M, Yanase S, Ishii T, Hartman PS, Matsumoto K, Ishii N (2005) The p38 signal transduction pathway participates in the oxidative stress-mediated translocation of DAF-16 to *Caenorhabditis elegans* nuclei. *Mech Ageing Dev.* 126, 642-647.
- Kraal P, Jansen B, Nierop KG, Verstraten JM (2006) Copper complexation by tannic acid in aqueous solution. *Chemosphere.* 65, 2193-2198.
- Kuc J (1995) Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annu Rev Phytopathol.* 33, 275-297.
- Labieniec M, Gabryelak T, Falcioni G (2003) Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. *Mutat Res.* 539, 19-28.
- Lakowski B, Hekimi S (1998) The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 13091-13096.
- Lamming DW, Wood JG, Sinclair DA (2004) Small molecules that regulate lifespan: evidence for xenohormesis. *Mol Microbiol.* 53, 1003-1009.
- Landry J, Sutton A, Tafrov ST, Heller RC, Stebbins J, Pillus L, Sternglanz R (2000) The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 5807-5811.
- Le Bourg E (2009) Hormesis, aging and longevity. *Biochim Biophys Acta.* 1790, 1030-1039.
- Le Bourg E, Minois N (1996) Failure to confirm increased longevity in *Drosophila melanogaster* submitted to a food restriction procedure. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 51, B280-B283.
- Lee SS, Kennedy S, Tolonen AC, Ruvkun G (2003) DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. *Science.* 300, 644-647.
- Lee KW, Lee HJ (2006) The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *Biofactors.* 26, 105-121.
- Lee GD, Wilson MA, Zhu M, Wolkow CA, de Cabo R, Ingram DK, Zou S (2006) Dietary deprivation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell.* 5, 515-524.

- Leenheer JA, Rostad CE (2004) Tannins and terpenoids as major precursors of Suwannee River fulvic acids. *US Geol Surv Sci Invest Report* (Denver, CO). 2004- 5276.
- Lenaerts I, Walker GA, Van Hoorebeke L, Gems D, Vanfleteren JR (2008) Dietary restriction of *Caenorhabditis elegans* by axenic culture reflects nutritional requirement for constituents provided by metabolically active microbes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 63, 242–252.
- Lewis JA, Fleming JT (1995) Basic culture methods. In: *Methods in Cell Biology, Vol. 48: Caenorhabditis elegans: Modern Biological Analysis of an Organism*. Eds.: Epstein HF, Shakes DC. Academic Press, San Diego, California.
- Li W, Fong HHS, Singletary KW, Fitzloff JF (2002) Determination of catechins in commercial grape seed extract. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 25, 397–407.
- Lin K, Hsin H, Libina N, Kenyon C (2001) Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat Genet*. 28, 139-145.
- Lin SJ, Kaeberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez PA, Culotta VC, Fink GR, Guarente L (2002) Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature*. 418, 344-348.
- Lindblom TH, Pierce GJ, Sluder AE (2001) A *C. elegans* orphan nuclear receptor contributes to xenobiotic resistance. *Curr Biol*. 11, 864–868.
- Lindsay DG (2005) Nutrition, hormetic stress and health. *Nutr Res Rev*. 18, 249-258.
- Lindsted KD, Tonstad S, Kuzma JW (1991) Self-report of physical activity and patterns of mortality in Seventh-Day Adventist men. *J Clin Epidemiol*. 44, 355-364.
- Link CD (2006) *C. elegans* models of age-associated neurodegenerative diseases: lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 41, 1007-1013.
- Lithgow GJ (2003) Does anti-aging equal anti-microbial? *Sci Aging Knowl Environ*. 2003, PE16.
- Lithgow GJ, White TM, Melov S, Johnson TE (1995) Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92, 7540-7544.
- Ljubuncic P, Reznick AZ (2009) The evolutionary theories of aging revisited--a mini-review. *Gerontology*. 55, 205-216.

- Lopes GK, Schulman HM, Hermes-Lima M (1999) Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim Biophys Acta*. 1472, 142-152.
- López-Vélez M, Martínez-Martínez F, Del Valle-Ribes C (2003) The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 43, 233-244.
- Madlener S, Illmer C, Horvath Z, Saiko P, Losert A, Herbacek I, Grusch M, Elford HL, Krupitza G, Bernhaus A, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T (2007) Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett*. 245, 156-162.
- Maeta K, Nomura W, Takatsume Y, Izawa S, Inoue Y (2007) Green tea polyphenols function as prooxidants to activate oxidative-stress-responsive transcription factors in yeasts. *Appl Environ Microbiol*. 73, 572-580.
- Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JL (2008) Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta*. 613, 1-19.
- Manach C, Mazur A, Scalbert A (2005) Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol*. 16, 77-84.
- Mandavilli BS, Santos JH, Van Houten B (2002) Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res*. 509, 127-151.
- Manini TM, Everhart JE, Patel KV, Schoeller DA, Colbert LH, Visser M, Tylavsky F, Bauer DC, Goodpaster BH, Harris TB (2006) Daily activity energy expenditure and mortality among older adults. *JAMA*. 296, 171-179.
- Martin B, Golden E, Carlson OD, Egan JM, Mattson MP, Maudsley S (2008) Caloric restriction: impact upon pituitary function and reproduction. *Ageing Res Rev*. 7, 209-224.
- Martínez DE (1998) Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra. *Exp Gerontol*. 33, 217-225.
- Marwan AG, Nagel CW (1986) Quantitative determination of infinite inhibition concentrations of antimicrobial agents. *Appl Environ Microbiol*. 51, 559-561.
- Masoro EJ (1991) Use of rodents as models for the study of "normal aging": conceptual and practical issues. *Neurobiol Aging*. 12, 639-643.
- Masoro EJ (2003) Subfield history: caloric restriction, slowing aging, and extending life. *Sci Aging Knowl Environ*. 2003, RE2.
- Masoro EJ, Yu BP, Bertrand HA (1982) Action of food restriction in delaying the aging process. *Proc Natl Acad Sci USA*. 79, 4239-4241.

- Mattson MP (2008) Hormesis defined. *Ageing Res Rev.* 7, 1-7.
- Mattson MP, Son TG, Camandola S (2007) Viewpoint: mechanisms of action and therapeutic potential of neurohormetic phytochemicals. *Dose Response.* 5, 174-186.
- Matyash V, Entchev EV, Mende F, Wilsch-Bräuninger M, Thiele C, Schmidt AW, Knölker HJ, Ward S, Kurzchalia TV (2004) Sterol-derived hormone(s) controls entry into diapause in *Caenorhabditis elegans* by consecutive activation of DAF-12 and DAF-16. *PLoS Biol.* 2, e280.
- McCay CM, Crowell MF (1934) Prolonging the Life Span. *Sci Mon.* 39, 405-414.
- McCay CM, Crowell MF, Maynard LA (1935) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J Nutr.* 10, 63-79.
- McClintock B (1941) The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics.* 26, 234-282.
- McElwee JJ, Schuster E, Blanc E, Thomas JH, Gems D (2004) Shared transcriptional signature in *Caenorhabditis elegans* Dauer larvae and long-lived *daf-2* mutants implicates detoxification system in longevity assurance. *J Biol Chem.* 279, 44533-44543.
- Medawar PB (1952) An Unsolved Problem of Biology: An inaugural lecture delivered at University College, London, 6 December, 1951. H. K. Lewis and Co., London.
- Medina I, Gallardo JM, Gonzalez MJ, Lois S, Hedges N (2007) Effect of molecular structure of phenolic families as hydroxycinnamic acids and catechins on their antioxidant effectiveness in minced fish muscle. *J Agric Food Chem.* 55, 3889-3895.
- Medvedev ZA (1990) An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 65, 375-398.
- Mellway RD, Tran LT, Prouse MB, Campbell MM, Constabel CP (2009) The wound-, pathogen-, and ultraviolet B-responsive MYB134 gene encodes an R2R3 MYB transcription factor that regulates proanthocyanidin synthesis in poplar. *Plant Physiol.* 150, 924-941.
- Menzel R, Reichert K, Achazi R (2002) Nutzung der induzierbaren Genexpression des Nematoden *Caenorhabditis elegans* als Biomonitor. *UWSF* 14, 18-23.
- Menzel R, Stürzenbaum S, Bärenwaldt A, Kulas J, Steinberg CE (2005) Humic material induces behavioral and global transcriptional responses in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Sci Technol.* 39, 8324-8332.

- Metcalfe NB, Monaghan P (2003) Growth versus lifespan: perspectives from evolutionary ecology. *Exp Gerontol.* 38, 935-940.
- Millet AC, Ewbank JJ (2004) Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Immunol.* 16, 4-9.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr (1980) Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol.* 15, 575-591.
- Miranda M, Ralph SG, Mellway R, White R, Heath MC, Bohlmann J, Constabel CP (2007) The transcriptional response of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) to infection by *Melampsora medusae* leaf rust involves induction of flavonoid pathway genes leading to the accumulation of proanthocyanidins. *Mol Plant Microbe Interact.* 20, 816-831.
- Mohri-Shiomi A, Garsin DA (2008) Insulin signaling and the heat shock response modulate protein homeostasis in the *Caenorhabditis elegans* intestine during infection. *J Biol Chem.* 283, 194-201.
- Molecular Research Center, Inc. (1995) TRI Reagent - RNA, DNA, protein isolation reagent. Manufacturer's protocol. Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH.
- Monaghan P, Haussmann MF (2006) Do telomere dynamics link lifestyle and lifespan? *Trends Ecol Evol.* 21, 47-53.
- Mörck C, Pilon M (2006) *C. elegans* feeding defective mutants have shorter body lengths and increased autophagy. *BMC Dev Biol.* 6, 39.
- Morcos M, Hutter H (2009) The model *Caenorhabditis elegans* in diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 16, 897-908.
- Morgan IJ, McCarthy ID, Metcalfe NB (2000) Life-history strategies and protein metabolism in overwintering juvenile Atlantic salmon: growth is enhanced in early migrants through lower protein turnover. *J Fish Biol.* 56, 637-647.
- Mosha TC, Gaga HE, Pace RD, Laswai HS, Mtebe K (1995) Effect of blanching on the content of antinutritional factors in selected vegetables. *Plant Foods Hum Nutr.* 47, 361-367.
- Mukai D, Matsuda N, Yoshioka Y, Sato M, Yamasaki T (2008) Potential anthelmintics: polyphenols from the tea plant *Camellia sinensis* L. are lethally toxic to *Caenorhabditis elegans*. *Nat Med. (Tokyo)* 62, 155-159.
- Mukhopadhyay A, Oh SW, Tissenbaum HA (2006) Worming pathways to and from DAF-16/FOXO. *Exp Gerontol.* 41, 928-934.

- Müller HJ (1938) The remaking of chromosomes. *The Collecting Net-Woods Hole* 13, 181-198.
- Muñoz MJ, Riddle DL (2003) Positive selection of *Caenorhabditis elegans* mutants with increased stress resistance and longevity. *Genetics*. 163, 171-180.
- Nakagawa H, Hasumi K, Woo JT, Nagai K, Wachi M (2004) Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate. *Carcinogenesis* 25, 1567-1574.
- Narayanan BA (2006) Chemopreventive agents alters global gene expression pattern: predicting their mode of action and targets. *Curr Cancer Drug Targets*. 6, 711-727.
- Neafsey PJ (1990) Longevity hormesis. A review. *Mech Ageing Dev*. 51, 1-31.
- Niho N, Shibutani M, Tamura T, Toyoda K, Uneyama C, Takahashi N, Hirose M (2001) Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. *Food Chem Toxicol*. 39, 1063-1070.
- Nohynek LJ, Alakomi HL, Kähkönen MP, Heinonen M, Helander IM, Oksman-Caldentey KM, Puupponen-Pimiä RH (2006) Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutr Cancer*. 54, 18-32.
- Oh SW, Mukhopadhyay A, Svrzikapa N, Jiang F, Davis RJ, Tissenbaum HA (2005) JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102, 4494-4499.
- Olshansky SJ (2010) The Law of Mortality Revisited: Interspecies Comparisons of Mortality. *J Comp Pathol*. 142, S4-S9
- Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M (2004) Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's beta-amyloid fibrils *in vitro*. *Biochim Biophys Acta*. 1690, 193-202.
- Ow YY, Stupans I (2003) Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab*. 4, 241-248.
- Pagano G, Castello G, Gallo M, Borriello I, Guida M (2008) Complex mixture-associated hormesis and toxicity: the case of leather tanning industry. *Dose Response*. 6, 383-396.
- Panizzi L, Caponi C, Catalano S, Cioni PL, Morelli I (2002) *In vitro* antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *J Ethnopharmacol*. 79, 165-168.

- Pardue ML, DeBaryshe PG (1999) Telomeres and telomerase: more than the end of the line. *Chromosoma*. 108, 73-82.
- Parkar SG, Stevenson DE, Skinner MA (2008) The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *Int J Food Microbiol*. 124, 295-298.
- Parker S, Baylis HA (2009) Overexpression of caveolins in *Caenorhabditis elegans* induces changes in egg-laying and fecundity. *Commun Integr Biol*. 2, 382-384.
- Partridge L (2008) Some highlights of research on aging with invertebrates, 2008. *Aging Cell*. 7, 605-608.
- Peden E, Killian DJ, Xue D (2008) Cell death specification in *C. elegans*. *Cell Cycle*. 7, 2479-2484.
- Perez VI, Bokov A, Van Remmen H, Mele J, Ran Q, Ikeno Y, Richardson A (2009) Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochim Biophys Acta*. 1790, 1005-1014.
- Pietsch K, Hofmann S, Henkel R, Saul N, Menzel R, Steinberg CEW (2010) The plant polyphenol caffeic acid affects life traits differently in the nematode *Caenorhabditis elegans* and the cladoceran *Moina macrocopa*. *Fresenius Environmental Bulletin* 19, 1238-1244.
- Pietsch K, Saul N, Menzel R, Stürzenbaum SR, Steinberg CE (2009) Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology*. 10, 565-578.
- Poulin G, Nandakumar R, Ahringer J (2004) Genome-wide RNAi screens in *Caenorhabditis elegans*: impact on cancer research. *Oncogene*. 23, 8340-8345.
- Proud CG (2004) The multifaceted role of mTOR in cellular stress responses. *DNA Repair*. 3, 927-934.
- Pun PB, Gruber J, Tang SY, Schaffer S, Ong RL, Fong S, Ng LF, Cheah I, Halliwell B (2010) Ageing in nematodes: do antioxidants extend lifespan in *Caenorhabditis elegans*? *Biogerontology*. 11, 17-30.
- Quevedo C, Kaplan DR, Derry WB (2007) AKT-1 regulates DNA-damage-induced germline apoptosis in *C. elegans*. *Curr Biol*. 17, 286-292.
- Raices M, Maruyama H, Dillin A, Karlseder J (2005) Uncoupling of longevity and telomere length in *C. elegans*. *PLoS Genet*. 1, e30.
- Ramassamy C (2006) Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol*. 545, 51-64.

- Rattan SI (2004a) Mechanisms of hormesis through mild heat stress on human cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1019, 554-558.
- Rattan SI (2004b) Aging intervention, prevention, and therapy through hormesis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 59, 705-709.
- Rea S, Johnson TE (2003) A metabolic model for life span determination in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell.* 5, 197-203.
- Reichert K, Menzel R (2005) Expression profiling of five different xenobiotics using a *Caenorhabditis elegans* whole genome microarray. *Chemosphere.* 61, 229-237.
- Riddle DL, Albert PS (1997) Genetic and environmental regulation of dauer larva development. In: *C. elegans II*. Eds.: Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 739-768.
- Robaszkiewicz A, Balcerczyk A, Bartosz G (2007) Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biol Int.* 31, 1245-1250.
- Rogério AP, Fontanari C, Borducchi E, Keller AC, Russo M, Soares EG, Albuquerque DA, Faccioli LH (2008) Anti-inflammatory effects of *Lafoensia pacari* and ellagic acid in a murine model of asthma. *Eur J Pharmacol.* 580, 262-270.
- Roginsky V (2003) Chain-breaking antioxidant activity of natural polyphenols as determined during the chain oxidation of methyl linoleate in Triton X-100 micelles. *Arch Biochem Biophys.* 414, 261-270.
- Rollo CD (2002) Growth negatively impacts the life span of mammals. *Evol Dev.* 4, 55-61.
- Rovira II, Finkel T (2008) Reactive Oxygen Species as Signaling Molecules. In: *Oxidative Stress in Aging: From Model Systems to Human Diseases*. Eds.: Miwa S, Beckman KB, Muller FL. Humana Press, Totowa, NJ, 293-308.
- Rozman KK (2005) Hormesis and risk assessment. *Hum Exp Toxicol.* 24, 255-257.
- Sagasti A, Hisamoto N, Hyodo J, Tanaka-Hino M, Matsumoto K, Bargmann CI (2001) The CaMKII UNC-43 activates the MAPKKK NSY-1 to execute a lateral signaling decision required for asymmetric olfactory neuron fates. *Cell.* 105, 221-232.
- Saito RM, van den Heuvel S (2002) Malignant worms: what cancer research can learn from *C. elegans*. *Cancer Invest.* 20, 264-275.
- Sakagami H, Satoh K (1997) Prooxidant action of two antioxidants: ascorbic acid and gallic acid. *Anticancer Res.* 17, 221-224.

- Sakagami H, Satoh K, Hatano T, Yoshida T, Okuda T (1997) Possible role of radical intensity and oxidation potential for gallic acid-induced apoptosis. *Anticancer Res.* 17, 377-380.
- Salunkhe DK, Chavan JK, Kadam SS (1990) Dietary Tannins: Consequences and Remedies. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Samanta S, Giri S, Parua S, Nandi DK, Pati BR, Mondal KC (2004) Impact of tannic acid on the gastrointestinal microflora. *Microb Ecol Health Dis.* 16, 32-34.
- Samuelson AV, Klimczak RR, Thompson DB, Carr CE, Ruvkun G (2007) Identification of *Caenorhabditis elegans* genes regulating longevity using enhanced RNAi-sensitive strains. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 72, 489-497.
- Sanyal R, Darroudi F, Parzefall W, Nagao M, Knasmüller S (1997) Inhibition of the genotoxic effects of heterocyclic amines in human derived hepatoma cells by dietary bioantimutagens. *Mutagenesis.* 12, 297-303.
- Saul N, Pietsch K, Menzel R, Steinberg CEW (2008) Quercetin-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: is DAF-16 involved? *Mech Ageing Dev.* 129, 611-613.
- Schaffitzel E, Hertweck M (2006) Recent aging research in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol.* 41, 557-563.
- Scheel J, Srinivasan J, Honnert U, Henske A, Kurzchalia TV (1999) Involvement of caveolin-1 in meiotic cell-cycle progression in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol.* 1, 127-129.
- Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R (2002) Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic Res.* 36, 177-187.
- Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M (2007) Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab.* 6, 280-293.
- Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura AM, Saura-Calixto F (2009) Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res.* 53, Suppl 2, S310-329.
- Shahrzad S, Aoyagi K, Winter A, Koyama A, Bitsch I (2001) Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J Nutr.* 131, 1207-1210.
- Shanley DP, Kirkwood TB (2006) Caloric restriction does not enhance longevity in all species and is unlikely to do so in humans. *Biogerontology.* 7, 165-168.

- Shay JW, Wright WE (2001) Telomeres and telomerase: implications for cancer and aging. *Radiat Res.* 155, 188-193.
- Sheps JA, Ralph S, Zhao Z, Baillie DL, Ling V (2004) The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biol.* 5, R15.
- Shibusawa Y, Yanagida A, Shindo H, Ito Y (2003) Separation of Apple Catechin Oligomers by CCC. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 26, 1609-1621.
- Shimokawa I, Chiba T, Yamaza H, Komatsu T (2008) Longevity genes: insights from calorie restriction and genetic longevity models. *Mol Cells.* 26, 427-435.
- Sinclair DA (2005) Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech Ageing Dev.* 126, 987-1002.
- Singh M, Arseneault M, Sanderson T, Murthy V, Ramassamy C (2008) Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *J Agric Food Chem.* 56, 4855-4873.
- Singleton VL (1981) Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Adv Food Res.* 27, 149-242.
- Smith RA, Pontiggia L, Waterman C, Lichtenwalner M, Wasserman J (2009) Comparison of motility, recovery, and methyl-thiazolyl-tetrazolium reduction assays for use in screening plant products for anthelmintic activity. *Parasitol Res.* 105, 1339-1343.
- Snow ET, Sykora P, Durham TR, Klein CB (2005) Arsenic, mode of action at biologically plausible low doses: what are the implications for low dose cancer risk? *Toxicol Appl Pharmacol.* 207, 557-564.
- Sohal RS (2002) Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med.* 33, 37-44.
- Sohal RS (2009) Life span extension in mice by food restriction depends on an energy imbalance. *J Nutr.* 139, 533-539.
- Sohal RS, Mockett R, Orr W (2002) Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med.* 33, 575-586.
- Sohal RS, Weindruch R (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* 273, 59-63.
- Sohi KK, Mittal N, Hundal MK, Khanduja KL (2003) Gallic acid, an antioxidant, exhibits antiapoptotic potential in normal human lymphocytes: A Bcl-2 independent mechanism. *J Nutr Sci Vitaminol.* 49, 221-227.

- Solomon A, Bandhakavi S, Jabbar S, Shah R, Beitel GJ, Morimoto RI (2004) *Caenorhabditis elegans* OSR-1 regulates behavioral and physiological responses to hyperosmotic environments. *Genetics*. 167, 161-170.
- Son TG, Camandola S, Mattson MP (2008) Hormetic dietary phytochemicals. *Neuromolecular Med.* 10, 236-246.
- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res.* 579, 200-213.
- Stanfel MN, Shamieh LS, Kaeberlein M, Kennedy BK (2009) The TOR pathway comes of age. *Biochim Biophys Acta.* 1790, 1067-1074.
- Stark M (2008) Hormesis, adaptation, and the sandpile model. *Crit Rev Toxicol.* 38, 641-644.
- Steinberg CEW, Saul N, Pietsch K, Meinelt T, Rienau S, Menzel R (2007): Dissolved humic substances facilitate fish life in extreme aquatic environments and have the potential to extend lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Annals of Environmental Science.* 1, 81-90.
- Steinberg CE, Stürzenbaum SR, Menzel R (2008) Genes and environment – striking the fine balance between sophisticated biomonitoring and true functional environmental genomics. *Sci Total Environ.* 400, 142-161.
- Stevenson DE, Hurst RD (2007) Polyphenolic phytochemicals—just antioxidants or much more? *Cell Mol Life Sci.* 64, 2900–2916.
- Stiernagle T (2006) Maintenance of *C. elegans*. In: *WormBook*. Eds.: The *C. elegans* Research Community, doi/10.1895/wormbook.1.101.1, <http://www.wormbook.org>
- Stoneman R (1994) The Alexander Romance: From History to Fiction. In: *Greek Fiction: The Greek Novel in Context*. Eds.: Morgan JR, Stoneman R. Routledge, London, 117–129.
- Strayer A, Wu Z, Christen Y, Link CD, Luo Y (2003) Expression of the small heatshock protein Hsp16-2 in *Caenorhabditis elegans* is suppressed by Ginkgo Biloba extract EGb 761. *FASEB J.* 17, 2305–2307.
- Strlic M, Radovic T, Kolar J, Pihlar B (2002) Anti- and prooxidative properties of gallic acid in fenton-type systems. *J Agric Food Chem.* 50, 6313-6317.
- Taffetani S, Ueno Y, Meng F, Venter J, Francis H, Glaser S, Alpini G, Patel T (2005) Tannic acid inhibits cholangiocyte proliferation after bile duct ligation via a cyclic adenosine 5',3'- monophosphate-dependent pathway. *Am J Pathol.* 166, 1671-1679.

- Taguri T, Tanaka T, Kouno I (2004) Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol Pharm Bull.* 27, 1965-1969.
- Tapia PC (2006) Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent fasting, exercise and dietary phytonutrients: "Mitohormesis" for health and vitality. *Med Hypotheses.* 66, 832-843.
- Teel RW (1986) Ellagic acid binding to DNA as a possible mechanism for its antimutagenic and anticarcinogenic action. *Cancer Lett.* 30, 329-336.
- Tesaki S, Tanabe S, Moriyama M, Fukushi E, Kawabata J, Watanabe M (1999) Isolation and identification of an antibacterial compound from grapes and its application to foods. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* 73, 19-22.
- Tissenbaum HA, Guarente L (2001) Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 410, 227-230.
- Traunspurger W, Steinberg C, Bongers T (1995) Nematoden in der ökotoxikologischen Forschung. *UWSF-Z Umweltchem Ökotox.* 7, 74-83.
- Tsuchiya M, Dang N, Kerr EO, Hu D, Steffen KK, Oakes JA, Kennedy BK, Kaeberlein M (2006) Sirtuin-independent effects of nicotinamide on lifespan extension from calorie restriction in yeast. *Aging Cell.* 5, 505-514.
- Tullet JM, Hertweck M, An JH, Baker J, Hwang JY, Liu S, Oliveira RP, Baumeister R, Blackwell TK (2008) Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell.* 132, 1025-1038.
- Turturro A, Hass BS, Hart RW (2000) Does caloric restriction induce hormesis? *Hum Exp Toxicol.* 19, 320-329.
- Twomey C, McCarthy JV (2005) Pathways of apoptosis and importance in development. *J Cell Mol Med.* 9, 345-359.
- Upton AC (2001) Radiation hormesis: data and interpretations. *Crit Rev Toxicol.* 31, 681-695.
- Vanfleteren JR, Braeckman BP (1999) Mechanisms of life span determination in *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiol Aging.* 20, 487-502.
- Varanka Z, Rojik I, Varanka I, Nemcsók J, Abrahám M (2001) Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 128, 467-478.

- Vattem DA, Lin YT, Labbe RG, Shetty K (2004) Antimicrobial activity against select food-borne pathogens by phenolic antioxidants enriched in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using the food grade fungus *Rhizopus oligosporus*. *Process Biochem.* 39, 1939–1946.
- Vattem DA, Shetty K (2005) Biological functionality of ellagic acid: a review. *Journal of Food Biochemistry.* 29, 234–266.
- Veluri R, Weir TL, Bais HP, Stermitz FR, Vivanco JM (2004) Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. *J Agric Food Chem.* 52, 1077–1082.
- Viswanathan M, Kim SK, Berdichevsky A, Guarente L (2005) A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span. *Dev Cell.* 9, 605–615.
- Walker G, Houthoofd K, Vanfleteren JR, Gems D (2005) Dietary restriction in *C. elegans*: from rate-of-living effects to nutrient sensing pathways. *Mech Ageing Dev.* 126, 929–937.
- Wang Y, Ezemaduka AN, Tang Y, Chang Z (2009) Understanding the mechanism of the dormant dauer formation of *C. elegans*: from genetics to biochemistry. *IUBMB Life.* 61, 607–612.
- Wang Y, Tissenbaum HA (2006) Overlapping and distinct functions for a *Caenorhabditis elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO. *Mech Ageing Dev.* 127, 48–56.
- Wauters T, Iserentant D, Verachtert H (2001) Sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to tannic acid is due to iron deprivation. *Can J Microbiol.* 47, 290–293.
- Weltje L, vom Saal FS, Oehlmann J (2005) Reproductive stimulation by low doses of xenoestrogens contrasts with the view of hormesis as an adaptive response. *Hum Exp Toxicol.* 24, 431–437.
- Wiegant FA, Surinova S, Ytsma E, Langelaar-Makkinje M, Wikman G, Post JA (2009) Plant adaptogens increase lifespan and stress resistance in *C. elegans*. *Biogerontology.* 10, 27–42.
- Wildner N, Tovar K (1999) Ein Wurm macht Karriere. *Biologen heute*, Ausgabe September bis Oktober.
- Williams GC (1957) Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution.* 11, 398–411.
- Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C (2004) Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Radic Biol Med.* 36, 838–849.

- Wilson MA, Shukitt-Hale B, Kalt W, Ingram DK, Joseph JA, Wolkow CA (2006) Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. 5, 59–68.
- Wolf M, Nunes F, Henkel A, Heinick A, Paul RJ (2008) The MAP kinase JNK-1 of *Caenorhabditis elegans*: location, activation, and influences over temperature-dependent insulin-like signaling, stress responses, and fitness. *J Cell Physiol*. 214, 721–729.
- Wolff S, Dillin A (2006) The trifecta of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*. 41, 894–903.
- Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair D (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*. 430, 686–689.
- Wu P, Jiang C, Shen Q, Hu Y (2009) Systematic gene expression profile of hypothalamus in calorie-restricted mice implicates the involvement of mTOR signaling in neuroprotective activity. *Mech Ageing Dev*. 130, 602–610.
- Wu Z, Smith JV, Paramasivam V, Butko P, Khan I, Cypser JR, Luo Y (2002) Ginkgo biloba extract EGb 761 increases stress resistance and extends life span of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Mol Biol. (Noisy-le-grand)* 48, 725–731.
- Xie T (2008) Physiology. Burn fat, live longer. *Science*. 322, 865–866.
- Yao HT, Chang YW, Lan SJ, Yeh TK (2008) The inhibitory effect of tannic acid on cytochrome P450 enzymes and NADPH-CYP reductase in rat and human liver microsomes. *Food Chem Toxicol*. 46, 645–653.
- Yashin AI, Cypser JR, Johnson TE, Michalski AI, Boyko SI, Novoseltsev VN (2001) Ageing and survival after different doses of heat shock: the results of analysis of data from stress experiments with the nematode worm *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev*. 122, 1477–1495.
- Yazawa K, Kihara T, Shen H, Shimmyo Y, Niidome T, Sugimoto H (2006) Distinct mechanisms underlie distinct polyphenol-induced neuroprotection. *FEBS Lett*. 580, 6623–6628.
- Young JA, Dillin A (2004) MAPping innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101, 12781–12782.
- Yu YM, Chang WC, Wu CH, Chiang SY (2005) Reduction of oxidative stress and apoptosis in hyperlipidemic rabbits by ellagic acid. *J Nutr Biochem*. 16, 675–681.
- Yu H, Larsen PL (2001) DAF-16-dependent and independent expression targets of DAF-2 insulin receptor-like pathway in *Caenorhabditis elegans* include FKBP. *J Mol Biol*. 314, 1017–1028.

- Zarse K, Schulz TJ, Birringer M, Ristow M (2007) Impaired respiration is positively correlated with decreased life span in *Caenorhabditis elegans* models of Friedreich Ataxia. *FASEB J.* 21, 1271-1275.
- Zaveri NT (2006) Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sci.* 78, 2073-2080.
- Zhang Z, Hamilton SM, Stewart C, Strother A, Teel RW (1993) Inhibition of liver microsomal cytochrome P450 activity and metabolism of the tobacco-specific nitrosamine NNK by capsaicin and ellagic acid. *Anticancer Res.* 13, 2341-2346.
- Zhang L, Jie G, Zhang J, Zhao B (2009) Significant longevity-extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress. *Free Radical Biol. Med.* 46, 414-421.
- Zhang Q, Pi J, Woods CG, Jarabek AM, Clewell HJ, Andersen ME (2008) Hormesis and adaptive cellular control systems. *Dose Response.* 6, 196-208.
- Zhang HJ, Xu L, Drake VJ, Xie L, Oberley LW, Kregel KC (2003) Heat-induced liver injury in old rats is associated with exaggerated oxidative stress and altered transcription factor activation. *FASEB J.* 17, 2293-2295.
- Zhu J, Filippich LJ, ALsalam MT (1992) Tannic acid intoxication in sheep and mice. *Res Vet Sci.* 53, 280-292.
- Zou S, Sinclair J, Wilson MA, Carey JR, Liedo P, Oropeza A, Kalra A, de Cabo R, Ingram DK, Longo DL, Wolkow CA (2007) Comparative approaches to facilitate the discovery of prolongevity interventions: effects of tocopherols on lifespan of three invertebrate species. *Mech Ageing Dev.* 128, 222-226.

Anhang

Tabelle A1: Verwendete Primer für die qRT-PCR

Gen	Primer-Sequenzen	Primer-Länge [bp]	GC-Gehalt [%]	Schmelz-Temperatur [°C]	Produkt-Länge [bp]
<i>act-1</i>	TCCAAGAGAGGTATCCTTAC	20	45	55,3	169
	CGGTTAGCCTTTGGATTGAG	20	50	57,3	
<i>cav-1</i>	GCGAGCAAAAGGAAGAGAAC	20	50	57,3	206
	AGCCAAGAGTGAGACAAGAC	20	50	57,3	
<i>glp-1</i>	AGCCGACGAAATCCCTCTCC	20	60	61,4	205
	TGCATTCACATCGGCTCCAG	20	55	59,4	
<i>lys-10</i>	GCGCTGGTACTCATGTATCC	20	55	59,4	318
	TGACTCCACATGGTCCTTTG	20	50	57,3	
<i>msp-64</i>	TCCGTACGACGACAAGCACACG	22	59	63,9	166
	TGCATCACACGAAACAGCCAAG	22	50	60,3	
<i>numr-1</i>	TGCTCCTGGAGCAACTGAAC	20	55	59,4	312
	TGACGACGATGTGGAGCTAC	20	55	59,4	
<i>pup-2</i>	ACGACGTTGTCGTGCTTCTG	20	55	59,4	365
	ATTCCCCAAATTGTGACGCC	20	50	57,3	
<i>sek-1</i>	CATGGCCAAGACTGTACAAG	20	50	57,3	300
	TCCGGATATTTGGGACGTTC	20	50	57,3	
<i>sod-5</i>	TGCCAATGCCGTTCTTCCAC	20	55	59,4	473
	CGCCAGCGTTTCCAGTCTTC	20	60	61,4	

Abkürzungen: bp=Basenpaare; A=Adenin; C=Cytosin; G=Guanin; T=Thymin

Tabelle A2: Einzelversuche zur Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Tanninsäure

Kondition	Minimale Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Mediane Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Maximale Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Mittlere Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	n K/TS	
	K	TS		K	TS		K	TS		K	TS			
15°C	100 µM	11,01 14,37	16,38 17,43	148,77 121,29	19,83 21,94	24,08 24,95	121,43 113,72	25,54 26,63	30,39 30,46	118,99 114,38	19,25 21,74	24,28 24,91	126,13** 114,58**	92/109 96/93
20°C	25 µM	10,17 10,31 9,42	9,53 9,45 9,11	93,71 91,66 96,71	16,33 14,55 15,18	16,18 16,63 16,77	99,08 114,30 110,47	23,02 20,65 20,26	25,55 26,65 23,96	110,99 129,06 118,26	16,88 15,38 15,50	17,55 17,58 17,44	103,97 114,30** 112,52**	99/93 97/97 112/103
	50 µM	10,17 10,31 9,42	11,69 11,59 10,02	114,95 112,42 106,37	16,33 14,55 15,18	18,35 18,00 17,66	112,37 123,71 116,34	23,02 20,65 20,26	23,73 25,08 25,30	103,08 121,45 124,88	16,88 15,38 15,50	18,41 18,58 18,39	109,06 120,81** 118,65**	99/90 97/107 112/114
	100 µM	10,32 9,30 7,36 8,67 10,49 9,18	13,50 10,84 11,45 9,43 14,95 12,27	130,81 116,56 155,57 108,77 142,52 133,66	17,00 14,86 18,17 12,77 16,14 13,56	19,67 17,71 20,60 14,68 18,33 17,50	115,71 119,18 113,37 114,96 113,57 129,06	22,99 23,32 24,30 20,00 22,30 20,10	24,28 23,70 26,44 21,59 25,97 23,36	105,61 101,63 108,81 107,95 116,46 116,22	17,16 16,38 17,58 14,00 16,54 14,59	19,91 17,87 20,03 15,71 21,71 17,95	116,03** 109,10* 113,94** 112,21** 131,26** 123,03**	211/186 104/124 98/88 120/113 99/133 115/102
	200 µM	9,30 9,95 9,18	13,06 10,95 9,60	140,43 110,05 104,58	14,86 14,96 13,56	19,41 16,29 12,54	130,62 108,89 92,48	23,32 19,60 20,10	23,98 20,84 20,90	102,83 106,33 103,98	16,38 15,48 14,59	19,37 16,67 14,46	118,25** 107,69* 99,11	104/132 120/136 115/83
	300 µM	9,95 8,67 9,18	8,12 9,67 9,02	81,61 111,53 98,26	14,96 12,77 13,56	16,00 14,18 12,00	106,95 111,04 88,50	19,60 20,00 20,10	22,00 19,60 17,87	112,24 98,00 88,91	15,48 14,00 14,59	15,74 14,80 13,11	101,68 105,71 89,86*	120/80 120/96 115/132
	400 µM	10,17 10,31 8,94	7,82 7,49 8,16	76,89 72,65 91,28	16,33 14,55 18,35	14,50 14,47 15,33	88,79 99,45 83,54	23,02 20,65 24,38	20,98 20,96 23,15	91,14 101,50 94,95	16,88 15,38 17,64	14,57 14,50 15,50	86,32** 94,28 87,87*	99/102 97/103 117/107

Fortsetzung Tabelle A2

Kondition	Minimale Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Mediane Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Maximale Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Mittlere Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	n	
	K	TS		K	TS		K	TS		K	TS		K/TS	
20°C	100 µM ^a	10,49	11,05	105,34	16,14	17,71	109,73	22,30	23,60	105,83	16,54	18,01	108,89*	99/96
		8,67	10,33	119,15	12,77	14,15	110,81	20,00	19,39	96,95	14,00	14,97	106,93	120/103
	100 µM ^b	8,36	10,34	123,68	13,11	15,35	117,09	21,20	23,36	110,19	14,49	16,47	113,66**	122/125
		8,94	12,75	142,62	17,50	21,71	124,06	22,82	27,43	120,20	16,91	21,17	125,19**	117/110
23°C	100 µM ^c	8,36	8,94	106,94	13,11	13,90	106,03	21,20	21,95	103,54	14,49	14,95	103,17	122/112
		8,94	8,32	93,06	17,50	18,00	102,86	22,82	26,07	114,24	16,91	17,44	103,13	117/108
	100 µM	5,70	9,23	161,93	9,50	16,61	174,84	15,07	20,31	134,77	10,50	16,36	155,81**	144/135
		6,22	8,78	141,16	9,20	14,94	162,39	15,15	17,83	117,69	10,49	14,54	138,61**	114/114

Abkürzungen: Tg=Tag; K=Kontrolle; TS=Tanninsäure; n=Anzahl

a= TS-Exposition nur bis zum 6. Adult-Tag; danach Kultivierung auf Kontrollplatten

b= Lebensdauer der F2-Generation; TS-Exposition in Generation P, F1 und F2

c= Lebensdauer der F2-Generation; TS-Exposition jedoch nur in Generation P und F1

* Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,05$

** Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,005$

Tabelle A3: Einzelversuche zur Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Gallussäure

Kondition	Minimale Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Mediane Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Maximale Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Mittlere Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	n K/GS
	K	GS		K	GS		K	GS		K	GS		
15°C	300 µM	11,15	13,05	117,04	19,57	20,50	25,83	26,53	102,71	19,40	20,81	107,27	114/113
		14,37	14,15	98,47	21,94	22,50	26,63	28,82	108,22	21,74	22,64	104,14	96/118
20°C	100 µM	10,49	10,02	95,52	16,14	15,92	22,30	22,60	101,35	16,54	16,70	100,97	99/135
		9,95	10,57	106,23	14,96	16,19	19,60	23,15	118,11	15,48	16,99	109,75**	120/81
	200 µM	9,18	10,33	112,53	13,56	14,58	20,10	20,18	100,40	14,59	15,42	105,69	115/113
		10,49	10,44	99,52	16,14	18,13	22,30	23,57	105,70	16,54	16,66	100,73	99/83
	300 µM	9,95	10,65	107,04	14,96	16,23	19,60	22,44	114,49	15,48	16,98	109,69**	120/169
		9,18	10,35	112,75	13,56	14,66	20,10	19,90	99,00	14,59	15,26	104,59	115/120
	400 µM	10,49	11,71	111,63	16,14	18,69	22,30	24,70	110,76	16,54	18,84	113,91**	99/125
		9,95	10,70	107,54	14,96	17,14	19,60	21,94	111,94	15,48	17,17	110,92**	120/134
	800 µM	9,18	10,53	114,71	13,56	15,07	20,10	21,97	109,30	14,59	16,10	110,35*	115/121
		10,19	11,45	112,37	18,06	17,79	24,16	24,02	99,42	17,78	18,37	103,32	107/89
23°C	300 µM a	10,32	10,90	105,62	17,00	18,57	22,99	23,82	103,61	17,16	18,33	106,82*	211/220
		10,19	9,53	93,52	18,06	17,50	24,16	25,70	106,37	17,78	18,34	103,15	107/118
	300 µM b	10,32	9,81	95,06	17,00	16,71	22,99	22,80	99,17	17,16	17,31	100,87	211/160
		10,19	10,20	100,10	18,06	17,92	24,16	24,55	101,61	17,78	18,41	103,54	107/99
	300 µM c	9,95	10,23	102,81	14,96	15,25	19,60	20,81	106,17	15,48	15,79	102,00	120/117
		10,19	12,41	121,79	18,06	20,17	24,16	24,79	102,61	17,78	19,81	111,42**	107/103
	300 µM	9,95	10,88	109,35	14,96	15,58	19,60	23,23	118,52	15,48	16,47	106,40*	120/142
		10,19	9,69	95,09	18,06	18,40	24,16	24,42	101,08	17,78	17,92	100,79	107/114
	300 µM	9,95	10,13	101,81	14,96	15,00	19,60	19,78	100,92	15,48	15,61	100,84	120/119
		6,04	6,50	107,62	9,29	12,00	15,10	18,00	119,21	10,50	12,53	119,33**	105/120
	300 µM	6,17	6,47	104,86	10,05	12,75	15,92	20,06	126,01	11,12	13,18	118,53**	125/97

Abkürzungen: Tg=Tag; K=Kontrolle; GS=Gallussäure; n=Anzahl; a= GS-Exposition nur bis zum 6. Adult-Tag; danach Kultivierung auf Kontrollplatten; b= Lebensdauer der F2-Generation, GS-Exposition in Generation P, F1 und F2; c= Lebensdauer der F2-Generation, GS-Exposition jedoch nur in Generation P und F1; * Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,05$; ** Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,005$

Tabelle A4: Einzelversuche zur Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Ellagsäure

Kondition	Minimale Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Mediane Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Maximale Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Mittlere Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	n K/ES
	K	ES		K	ES		K	ES		K	ES		
15°C	50 µM	11,15	13,55	121,52	19,57	20,64	105,47	25,83	25,18	97,48	19,40	20,51	114/134
		14,37	14,10	98,12	21,94	21,33	97,22	26,63	25,26	94,86	21,74	21,03	96/112
20°C	25 µM	10,49	10,85	103,43	16,14	17,31	107,25	22,30	23,93	107,31	16,54	17,55	99/132
		10,34	10,72	103,68	16,00	16,71	104,44	22,80	23,07	101,18	17,05	17,26	114/118
	50 µM	10,19	11,08	108,73	18,06	20,12	111,41	24,16	25,00	103,48	17,78	19,30	107/90
		10,49	11,11	105,91	16,14	17,83	110,47	22,30	24,26	108,79	16,54	18,15	99/172
		10,53	11,44	108,64	16,65	18,56	111,47	23,23	25,56	110,03	17,37	18,88	153/172
	100 µM	9,95	10,27	103,22	14,96	15,17	101,40	19,60	20,50	104,59	15,48	15,87	120/120
		9,18	9,55	104,03	13,56	12,73	93,88	20,10	19,88	98,91	14,59	14,49	115/92
	200 µM	9,18	9,91	107,95	13,56	13,14	96,90	20,10	18,73	93,18	14,59	14,24	115/91
		9,95	11,32	113,77	14,96	16,55	110,63	19,60	21,64	110,41	15,48	16,36	120/130
		10,32	10,08	97,67	17,00	16,65	97,94	22,99	22,67	98,61	17,16	16,88	211/196
23°C	300 µM	9,95	9,76	98,09	14,96	15,38	102,81	19,60	20,67	105,46	15,48	15,83	120/126
		9,18	9,14	99,56	13,56	12,89	95,06	20,10	20,08	99,90	14,59	14,21	115/106
	50 µM a	10,32	11,20	108,53	17,00	15,54	91,41	22,99	22,23	96,69	17,16	14,74	211/202
		10,19	9,72	95,39	18,06	18,92	104,76	24,16	24,39	100,95	17,78	18,35	107/123
	50 µM b	10,49	10,32	98,38	16,14	16,17	100,19	22,30	22,54	101,08	16,54	16,80	99/102
		10,19	11,19	109,81	18,06	20,28	112,29	24,16	25,63	106,08	17,78	19,56	107/105
	50 µM c	10,49	11,00	104,86	16,14	17,60	109,05	22,30	24,44	109,60	16,54	17,95	99/118
		10,19	11,63	114,13	18,06	17,03	94,30	24,16	23,00	95,20	17,78	17,67	107/90
		10,49	10,55	100,57	16,14	16,71	103,53	22,30	22,98	103,05	16,54	17,25	99/122
	50 µM	6,04	6,60	109,27	9,29	10,31	110,98	15,10	14,91	98,74	10,50	11,12	105/109

Abkürzungen: Tg=Tag; K=Kontrolle; ES=Ellagsäure; n=Anzahl; a= ES-Exposition nur bis zum 6. Adult-Tag; danach Kultivierung auf Kontrollplatten;

b= Lebensdauer der F2-Generation, ES-Exposition in Generation P, F1 und F2; c= Lebensdauer der F2-Generation, ES-Exposition jedoch nur in Generation P und F1; * Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,05$; ** Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,005$

Tabelle A5: Einzelversuche zur Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Catechin

Kondition	Minimale Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Mediane Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Maximale Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Mittlere Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	n K/CT
	K	CT		K	CT		K	CT		K	CT		
15°C	14,96 13,71	17,20 16,37	114,97 119,40	21,62 20,17	24,28 23,74	112,30 117,70	26,82 27,10	30,23 30,20	112,71 111,44	21,62 20,40	24,32 24,10	112,49** 118,14**	79/93 84/100
	10,08	9,48	94,05	15,75	19,87	126,16	26,63	26,95	101,20	17,79	19,59	110,12	85/83
100 µM	12,06 9,48	12,30 11,41	101,99 120,36	17,57 14,21	18,07 14,92	102,85 105,00	22,78 20,18	25,30 19,77	111,06 97,97	17,89 14,71	18,90 16,15	105,65* 109,79*	141/145 123/155
	10,08	12,52	124,21	15,75	20,25	128,57	26,63	26,48	99,44	17,79	20,12	113,10	85/86
200 µM	10,68 12,06	12,67 12,07	118,63 100,08	17,00 17,57	19,98 18,36	117,53 104,50	22,86 22,78	23,75 25,80	103,89 113,26	17,26 17,89	19,61 18,89	113,62** 105,59*	150/189 141/150
	9,48	9,80	103,38	14,21	14,49	101,97	20,18	19,30	95,64	14,71	15,00	101,97	123/139
300 µM	10,68 8,36	11,78 9,39	110,30 112,32	17,00 13,11	18,57 14,42	109,24 109,99	22,86 21,20	23,22 21,88	101,57 103,21	17,26 14,49	18,22 15,40	105,56 106,28	150/183 122/106
20°C	10,32 9,54	11,88 8,53	115,12 89,41	17,00 14,00	18,22 16,17	107,18 115,50	22,99 20,97	23,43 23,57	101,91 112,40	17,16 15,12	18,39 16,33	107,17 108,00**	211/181 112/126
800 µM	10,32 9,54	11,51 9,40	111,53 98,53	17,00 14,00	18,19 15,87	107,00 113,36	22,99 20,97	24,33 21,35	105,83 101,81	17,16 15,12	18,34 16,04	106,88* 106,08	211/194 112/102
200 µM a	9,42 8,81	10,11 9,28	107,32 105,33	14,28 18,14	14,47 18,52	101,33 102,09	22,80 24,37	21,49 25,61	94,25 105,09	15,69 17,45	15,69 18,34	100,00 105,10	118/121 108/127
200 µM b	9,42 8,81	10,49 9,74	111,36 110,56	14,28 18,14	15,73 19,23	110,15 106,01	22,80 24,37	23,76 28,00	104,21 114,90	15,69 17,45	16,92 19,05	107,84 109,17**	118/132 108/120
200 µM c	9,42 8,81	9,79 9,55	103,93 108,40	14,28 18,14	14,47 17,38	101,33 95,81	22,80 24,37	22,93 25,97	100,57 106,57	15,69 17,45	15,68 17,18	99,94 98,45	118/112 108/121
23°C	7,51 7,40	7,90 8,74	105,19 118,11	10,95 11,50	11,93 12,00	108,95 104,35	16,65 17,50	19,12 18,50	114,83 105,71	11,91 12,14	13,21 13,46	110,92* 110,87	77/94 85/82

Abkürzungen: Tg=Tage; K=Kontrolle; CT=Kontrolle; n=Anzahl; a= CT-Exposition nur bis zum 6. Adult-Tag; danach Kultivierung auf Kontrollplatten;

b= Lebensdauer der F2-Generation, CT-Exposition in Generation P, F1 und F2; c= Lebensdauer der F2-Generation, CT-Exposition jedoch nur in Generation P und F1; * Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,05$; ** Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,005$

Tabelle A6: Einzelversuche zur Modulation der Lebensdauer von Wildtyp-Nematoden durch Tannine bei Fütterung toter Bakterien

Kondition	Minimale Lebensdauer [Tg]		Variation [%]		Mediane Lebensdauer [Tg]		Variation [%]		Maximale Lebensdauer [Tg]		Variation [%]		Mittlere Lebensdauer [Tg]		Variation [%]		n K/ Tannin
	K	Tannin			K	Tannin			K	Tannin			K	Tannin			
TS 100 µM	12,74	21,30	167,19		26,57	31,42	118,25		39,40	39,70	100,76		25,89	31,30	120,90*		100/115
	11,49	15,17	132,03		26,00	30,33	116,65		36,98	37,35	101,00		24,70	28,96	117,25*		101/96
TS 100 µM ^a	12,74	16,70	131,08		26,57	28,67	107,90		39,40	38,35	97,34		25,89	28,23	109,04		100/83
	11,49	12,50	108,79		26,00	25,82	99,31		36,98	36,38	98,38		24,70	25,72	104,13		101/111
GS 300 µM	11,51	10,32	89,66		29,37	25,49	86,79		39,25	39,85	101,53		26,87	25,70	95,65		100/96
	11,95	13,64	114,14		29,87	31,00	103,78		38,90	40,10	103,08		27,11	28,15	103,84		104/108
GS 300 µM ^a	11,51	13,65	118,59		29,37	30,22	102,89		39,25	38,99	99,34		26,87	28,13	104,69		100/111
	11,95	11,28	94,39		29,87	27,67	92,63		38,90	38,70	99,49		27,11	26,28	96,94		104/105
ES 50 µM	11,51	11,46	99,57		29,37	27,75	94,48		39,25	37,60	95,80		26,87	26,10	97,13		100/116
	11,95	14,74	123,35		29,87	31,13	104,22		38,90	37,47	96,32		27,11	27,12	100,04		104/111
ES 50 µM ^a	11,51	11,90	103,39		29,37	25,80	87,84		39,25	37,80	96,31		26,87	25,80	96,02		100/120
	11,95	13,95	116,74		29,87	27,83	93,17		38,90	39,30	101,03		27,11	27,51	101,48		104/107
CT 200 µM	10,73	13,63	127,03		28,56	28,92	101,26		37,27	40,00	107,32		24,90	26,95	108,23*		134/100
	11,05	12,32	111,49		29,12	32,75	112,47		36,58	38,35	104,84		25,86	29,62	114,54**		106/104
CT 200 µM ^a	11,43	14,80	129,48		26,50	33,00	124,53		39,50	36,47	92,33		25,38	27,35	107,76		90/85
	11,05	13,77	124,62		29,12	29,13	100,03		36,58	34,94	95,52		25,86	26,16	101,16		106/128
	11,43	14,30	125,11		26,50	29,15	110,00		39,50	37,98	96,15		25,38	26,57	104,69		90/91

Abkürzungen: Tg=Tag; K=Kontrolle; TS=Tanninsäure; GS=Gallussäure; ES=Ellagsäure; CT=Catechin; n=Anzahl; a= Tannin-Exposition nur bis zum 6. Adult-Tag; danach Kultivierung auf Kontrollplatten;

* Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,05$; ** Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,005$

Tabelle A7: Lebensdauer von TS-behandelten Mutantenstämmen (Mittelwerte)

T	Genotyp	Mediane Lebensdauer [Tg] ± SEM		Variation [%] ± SEM	Mittlere Lebensdauer [Tg] ± SEM		Variation [%] ± SEM	n K/TS	n Ver- suche
		K	TS		K	TS			
15°C	N2 (zum Vergleich)	20,89 ± 1,06	24,52 ± 0,43	117,58 ± 3,86	20,50 ± 1,25	24,60 ± 0,32	120,36** ± 5,78	188/202	2
	<i>sek-1 (ag1)</i> (100 µM TS)	18,10 ± 1,17	14,95 ± 0,50	83,25 ± 3,49	18,01 ± 0,75	15,89 ± 0,55	88,34** ± 1,40	159/163	4
	<i>sek-1 (ag1)</i> (50 µM TS)	14,48 ± 0,52	14,39 ± 0,10	99,72 ± 4,42	15,83 ± 0,41	15,48 ± 0,38	97,86 ± 2,87	119/114	3
	<i>sek-1 (ag1)</i> (25 µM TS)	14,48 ± 0,52	14,59 ± 0,36	100,86 ± 1,65	15,83 ± 0,41	15,87 ± 0,27	100,26 ± 1,60	119/119	3
20°C	N2 (zum Vergleich)	15,42 ± 0,84	18,08 ± 0,84	117,64 ± 2,44	16,04 ± 0,58	18,86 ± 0,86	117,60** ± 3,33	747/746	6
	<i>age-1 (hx546)</i>	17,86 ± 0,14	26,42 ± 1,58	147,88 ± 7,68	18,71 ± 0,44	25,26 ± 1,15	135,01** ± 3,03	219/201	2
	<i>akt-2 (ok393)</i>	19,50 ± 1,00	23,01 ± 0,58	118,44 ± 9,02	19,97 ± 0,52	22,61 ± 0,06	113,33** ± 2,71	224/227	2
	<i>cav-1 (ok2089)</i>	16,11 ± 0,96	18,18 ± 0,45	113,42 ± 9,55	16,76 ± 0,31	18,81 ± 0,55	111,40** ± 6,33	222/230	2
	<i>daf-12 (m20)</i>	9,87 ± 0,14	12,92 ± 0,04	130,99 ± 1,38	12,62 ± 0,33	14,90 ± 0,21	118,25** ± 4,74	226/204	2
	<i>daf-16 (mgDf50)</i>	8,90 ± 0,22	11,55 ± 0,13	129,84 ± 4,62	10,10 ± 0,10	12,39 ± 0,15	122,70** ± 2,67	234/204	2
	<i>eat-2 (ad465)</i>	23,14 ± 1,74	24,05 ± 2,35	104,75 ± 11,30	23,12 ± 1,21	24,10 ± 1,56	104,75 ± 8,21	178/189	3
	<i>jnk-1 (gk7)</i>	15,69 ± 0,38	17,91 ± 0,29	114,17 ± 0,92	15,06 ± 0,26	18,16 ± 0,14	121,02** ± 2,66	219/198	2
	<i>mev-1 (kn1)</i>	9,70 ± 0,29	9,79 ± 0,48	100,81 ± 2,06	10,28 ± 0,32	10,63 ± 0,29	103,42* ± 0,46	257/258	3
	<i>nhr-8 (ok186)</i>	8,98 ± 0,09	14,03 ± 2,34	156,00 ± 24,50	10,11 ± 0,16	15,13 ± 1,88	149,32** ± 16,19	202/170	2
	<i>numr-1(ok2239)</i>	18,61 ± 0,53	21,31 ± 0,62	114,51 ± 0,07	18,54 ± 0,25	20,98 ± 0,72	113,16** ± 2,40	200/233	2
	<i>osr-1 (rm1)</i>	10,99 ± 0,20	13,92 ± 0,48	126,80 ± 6,69	12,38 ± 0,34	14,63 ± 0,22	118,32** ± 5,09	193/207	2
	<i>sir-2.1 (ok434)</i>	13,55 ± 0,13	16,65 ± 0,17	122,84 ± 0,11	14,67 ± 0,08	17,24 ± 0,60	117,45** ± 3,38	230/235	2
	<i>skn-1 (zu67)</i>	11,48 ± 0,59	17,12 ± 2,45	150,66 ± 29,12	12,67 ± 0,42	18,13 ± 0,77	143,50** ± 10,77	185/185	2
	<i>unc-43 (n498n1186)</i>	11,20 ± 0,43	17,23 ± 1,42	153,53 ± 6,83	13,27 ± 0,35	17,59 ± 0,77	132,44** ± 2,33	226/216	2
23°C	N2 (zum Vergleich)	9,35 ± 0,15	15,78 ± 0,84	168,62 ± 6,22	10,50 ± 0,01	15,45 ± 0,91	147,21** ± 8,60	258/249	2
	<i>daf-2 (m577)</i>	13,16 ± 0,40	20,59 ± 0,09	156,65 ± 4,14	15,70 ± 0,46	19,80 ± 0,30	126,16** ± 1,77	181/193	2

Abkürzungen: Tg=Tage; SEM=Standardfehler des Mittelwertes; K=Kontrolle; TS=Tanninsäure; n=Anzahl; T=Temperatur; * Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,05$

** Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,005$

Tabelle A8: Lebensdauer von TS-behandelten Mutantenstämmen (Einzelversuche)

T	Genotyp	Mediane Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Mittlere Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	n K / TS
		K	TS		K	TS		
15°C	<i>sek-1 (ag1)</i> (100 µM TS)	14,77	13,50	91,40	15,93	14,24	89,39	30/33
		19,37	15,42	79,61	19,33	16,49	85,28*	51/43
		18,25	15,75	86,30	17,89	16,40	91,68*	36/45
		20,00	15,14	75,70	18,88	16,43	87,01*	42/42
	<i>sek-1 (ag1)</i> (50 µM TS)	15,00	14,26	95,07	15,81	14,76	93,34	48/50
		15,00	14,33	95,53	16,56	16,07	97,04	32/28
		13,44	14,59	108,56	15,13	15,61	103,19	39/36
	<i>sek-1 (ag1)</i> (25 µM TS)	15,00	14,68	97,87	15,81	15,54	98,26	48/54
		15,00	15,17	101,13	16,56	16,41	99,09	32/34
		13,44	13,92	103,57	15,13	15,65	103,42	39/31
20°C	<i>age-1 (hx546)</i>	17,71	24,83	140,20	18,27	24,11	131,98**	108/99
		18,00	28,00	155,56	19,14	26,41	138,03**	111/102
	<i>akt-2 (ok393)</i>	20,50	22,43	109,41	20,49	22,67	110,62*	114/111
		18,50	23,58	127,46	19,44	22,55	116,03*	110/116
	<i>cav-1 (ok2089)</i>	15,15	18,63	122,97	16,44	19,35	117,72**	120/110
		17,07	17,73	103,87	17,07	18,26	105,07*	102/120
	<i>daf-12 (m20)</i>	9,73	12,88	132,37	12,29	15,11	122,99**	118/97
		10,00	12,96	129,60	12,94	14,69	113,50*	108/107
	<i>daf-16 (mgDf50)</i>	9,12	11,42	125,22	10,19	12,23	120,03**	138/122
		8,68	11,67	134,45	10,00	12,54	125,37**	96/82
	<i>eat-2 (ad465)</i>	26,00	27,80	106,92	24,77	26,68	107,71	64/71
		23,43	19,72	84,17	23,83	21,28	89,28*	54/43
		20,00	24,63	123,15	20,75	24,33	117,27*	60/75
	<i>jnk-1 (gk7)</i>	15,31	17,62	115,09	14,80	18,30	123,67**	113/104
		16,07	18,20	113,25	15,32	18,02	118,36**	106/94
	<i>mev-1 (kn1)</i>	10,17	10,55	103,74	10,72	11,06	103,22	81/98
		9,18	8,89	96,84	9,67	10,08	104,29	84/74
		9,75	9,93	101,85	10,46	10,74	102,75	92/86
	<i>nhr-8 (ok186)</i>	8,89	11,69	131,50	9,95	13,25	133,13**	84/80
		9,07	16,37	180,49	10,27	17,00	165,51**	118/90
	<i>numr-1(ok2239)</i>	19,14	21,93	114,58	18,78	21,70	115,55**	103/132
		18,08	20,69	114,44	18,29	20,26	110,76*	97/101
	<i>osr-1 (rm1)</i>	11,19	13,44	120,11	12,72	14,41	113,23*	97/116
		10,78	14,39	133,49	12,03	14,85	123,40**	96/91
	<i>sir-2.1 (ok434)</i>	13,68	16,82	122,95	14,75	17,83	120,83**	113/126
		13,42	16,47	122,73	14,59	16,64	114,07*	117/109
	<i>skn-1 (zu67)</i>	10,88	19,56	179,78	12,25	18,90	154,27**	83/82
		12,07	14,67	121,54	13,08	17,36	132,73**	102/103
<i>unc-43 (n498n1186)</i>	11,63	18,65	160,36	13,62	18,36	134,77**	100/121	
	10,77	15,80	146,70	12,92	16,81	130,11**	126/95	
23°C	<i>daf-2 (m577)</i>	12,75	20,50	160,78	16,16	20,10	124,39*	82/90
		13,56	20,68	152,51	15,23	19,49	127,92**	99/103

Abkürzungen: Tg=Tage; K=Kontrolle; TS=Tanninsäure; n=Anzahl; T=Temperatur

* Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,05$ ** Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,005$

Tabelle A9: Lebensdauer von CT-behandelten Mutantenstämmen (Mittelwerte)

T	Genotyp	Mediane Lebensdauer [Tg] ± SEM		Variation [%] ± SEM	Mittlere Lebensdauer [Tg] ± SEM		Variation [%] ± SEM	n K/ CT	n Ver- suche
		K	CT		K	CT			
15°C	N2 (zum Vergleich)	20,90 ± 0,72	24,01 ± 0,27	115,00 ± 2,70	21,01 ± 0,61	24,21 ± 0,11	115,32** ± 2,83	163/193	2
	<i>sek-1 (ag1)</i>	16,27 ± 0,76	18,08 ± 1,48	110,84 ± 6,49	16,95 ± 0,67	18,83 ± 0,73	111,16* ± 2,40	104/122	4
20°C	N2 (zum Vergleich)	16,13 ± 0,75	18,27 ± 1,33	113,14 ± 6,17	16,91 ± 0,75	18,41 ± 1,16	108,57** ± 2,86	499/564	4
	<i>akt-2 (ok393)</i>	18,73 ± 0,77	19,44 ± 0,20	104,15 ± 4,48	19,22 ± 0,59	19,73 ± 0,27	102,79 ± 2,46	360/309	3
	<i>cav-1 (ok2089)</i>	16,11 ± 0,96	17,07 ± 0,57	106,10 ± 2,82	16,76 ± 0,31	17,88 ± 0,23	106,70** ± 0,61	222/181	2
	<i>daf-12 (m20)</i>	9,83 ± 1,18	10,41 ± 1,17	106,05 ± 0,78	11,09 ± 1,80	12,05 ± 1,43	109,49* ± 4,83	171/185	2
	<i>daf-16 (mgDf50)</i>	11,37 ± 0,99	12,17 ± 1,42	106,12 ± 3,33	11,95 ± 0,92	12,75 ± 1,22	106,21** ± 2,14	712/781	4
	<i>eat-2 (ad465)</i>	23,14 ± 1,74	24,49 ± 2,30	105,77 ± 4,71	23,12 ± 1,21	23,98 ± 1,16	103,79 ± 0,83	178/206	3
	<i>jnk-1 (gk7)</i>	14,38 ± 0,63	15,12 ± 0,50	105,20 ± 1,30	14,84 ± 0,53	15,65 ± 0,39	105,59** ± 1,21	411/398	3
	<i>mev-1 (kn1)</i>	8,75 ± 0,76	8,88 ± 0,92	101,30 ± 3,49	9,59 ± 0,86	9,66 ± 0,92	100,70 ± 1,88	326/310	3
	<i>nhr-8 (ok186)</i>	10,16 ± 0,32	10,55 ± 0,18	104,20 ± 5,17	12,54 ± 0,39	12,77 ± 0,24	101,98 ± 1,65	508/533	3
	<i>numr-1(ok2239)</i>	18,61 ± 0,53	19,94 ± 1,06	107,05 ± 2,67	18,54 ± 0,25	19,84 ± 0,58	107,02** ± 1,72	200/212	2
	<i>osr-1 (rm1)</i>	12,46 ± 0,34	14,65 ± 0,15	117,64 ± 2,00	13,86 ± 0,29	15,75 ± 0,00	113,70** ± 2,46	228/271	2
	<i>sir-2.1 (ok434)</i>	13,97 ± 1,13	14,60 ± 1,22	104,50 ± 1,10	14,71 ± 0,92	15,56 ± 0,92	105,88** ± 1,87	302/348	4
	<i>skn-1 (zu67)</i>	8,54 ± 0,78	8,70 ± 0,17	102,48 ± 7,31	9,54 ± 0,54	10,65 ± 0,53	111,73** ± 0,71	149/153	2
	<i>unc-43 (n498n1186)</i>	13,03 ± 1,98	13,56 ± 2,23	103,60 ± 1,71	13,43 ± 1,78	14,00 ± 1,98	103,99* ± 1,09	485/518	3
23°C	N2 (zum Vergleich)	11,23 ± 0,28	11,97 ± 0,04	106,65 ± 2,30	12,03 ± 0,12	13,34 ± 0,12	110,90** ± 0,02	162/176	2
	<i>age-1 (hx546)</i>	13,05 ± 0,80	13,85 ± 0,82	106,19 ± 0,26	15,89 ± 0,21	17,65 ± 0,15	111,05** ± 0,49	306/363	2
	<i>daf-2 (m577)</i>	15,50 ± 2,24	16,24 ± 3,02	103,95 ± 11,64	18,20 ± 0,68	18,24 ± 1,61	100,21 ± 8,34	321/371	3

Abkürzungen: Tg=Tage; SEM=Standardfehler des Mittelwertes; K=Kontrolle; CT=Catechin; n=Anzahl;
T=Temperatur

* Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,05$

** Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,005$

Tabelle A10: Lebensdauer von CT-behandelten Mutantenstämmen (Einzelversuche)

T	Genotyp	Mediane Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Mittlere Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	n K / CT
		K	CT		K	CT		
15°C	<i>sek-1 (ag1)</i>	14,58	14,12	96,84	15,07	16,79	111,41	29/38
		16,25	17,50	107,69	17,09	19,15	112,05	22/26
		18,25	20,20	110,68	18,20	19,07	104,78	25/30
		16,00	20,50	128,13	17,43	20,29	116,41*	28/28
20°C	<i>akt-2 (ok393)</i>	19,83	19,75	99,60	20,04	20,26	101,10	142/148
		17,24	19,50	113,11	18,08	19,46	107,63	126/77
		19,12	19,07	99,74	19,53	19,46	99,64	92/84
	<i>cav-1 (ok2089)</i>	17,07	17,63	103,28	17,07	18,11	106,09	102/105
		15,15	16,50	108,91	16,44	17,64	107,30	120/76
	<i>daf-12 (m20)</i>	8,65	9,24	106,82	9,29	10,62	114,32**	92/109
		11,00	11,58	105,27	12,88	13,48	104,66	79/76
	<i>daf-16 (mgDf50)</i>	8,86	8,70	98,19	9,80	9,88	100,82	233/178
		13,72	15,63	113,92	14,31	15,85	110,76**	162/225
		11,35	11,81	104,05	11,79	12,39	105,09*	145/188
		11,56	12,52	108,30	11,89	12,86	108,16**	172/190
	<i>eat-2 (ad465)</i>	26,00	29,07	111,81	24,77	25,78	104,08	64/67
		23,43	22,61	96,50	23,83	24,36	102,22	54/59
		20,00	21,80	109,00	20,75	21,80	105,06	60/80
	<i>jnk-1 (gk7)</i>	13,14	14,15	107,69	15,48	16,11	104,07**	154/159
		15,15	15,85	104,62	13,78	14,88	107,98	143/138
		14,86	15,35	103,30	15,25	15,97	104,72	114/101
	<i>mev-1 (kn1)</i>	9,70	10,46	107,84	10,91	11,28	103,39	99/132
		7,25	7,26	100,14	7,96	8,09	101,63	156/108
		9,29	8,91	95,91	9,89	9,60	97,07	71/70
	<i>nhr-8 (ok186)</i>	10,29	10,50	102,04	11,82	12,30	104,06	215/237
		9,55	10,89	114,03	12,64	13,04	103,16	176/189
		10,63	10,26	96,52	13,15	12,98	98,71	117/107
	<i>numr-1(ok2239)</i>	19,14	21,00	109,72	18,78	20,42	108,73**	103/118
		18,08	18,87	104,37	18,29	19,26	105,30	97/94
	<i>osr-1 (rm1)</i>	12,79	14,79	115,64	14,15	15,74	111,24**	141/161
		12,12	14,50	119,64	13,56	15,75	116,15**	87/110
	<i>sir-2.1 (ok434)</i>	13,44	13,83	102,90	14,57	14,99	102,88	81/69
		11,25	11,64	103,47	12,53	13,30	106,15	53/71
		16,71	17,36	103,89	17,01	17,59	103,41	97/127
		14,46	15,58	107,75	14,72	16,35	111,07*	71/81
	<i>skn-1 (zu67)</i>	9,32	8,87	95,17	10,07	11,18	111,02	57/64
		7,76	8,52	109,79	9,00	10,12	112,44*	92/89
	<i>unc-43 (n498n1186)</i>	9,07	9,10	100,33	9,88	10,06	101,82	223/240
		14,98	15,63	104,34	14,92	15,70	105,23*	149/151
		15,04	15,96	106,12	15,48	16,24	104,91	113/127
23°C	<i>age-1 (hx546)</i>	12,24	13,03	106,45	15,68	17,49	111,54	148/138
		13,85	14,67	105,92	16,10	17,80	110,56**	158/225
	<i>daf-2 (m577)</i>	19,66	19,86	101,02	19,56	19,61	100,26	153/209
		12,00	10,25	85,42	17,53	15,03	85,74	94/90
		14,83	18,60	125,42	17,51	20,07	114,62	74/72

Abkürzungen: Tg=Tage; K=Kontrolle; CT=Catechin; n=Anzahl; T=Temperatur; * Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,05$; ** Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,005$

A11: Lebensdauer von GS- und ES-behandelten Mutantenstämmen (Mittelwerte)

Tannin	Genotyp	Mediane Lebensdauer [Tg] ± SEM		Variation [%] ± SEM	Mittlere Lebensdauer [Tg] ± SEM		Variation [%] ± SEM	n K/ Tannin	n Ver- suche
		K	Tannin		K	Tannin			
Gallussäure	<i>eat-2 (ad465)</i>	23,14 ± 1,74	25,42 ± 1,43	110,55 ± 6,75	23,12 ± 1,21	24,62 ± 0,80	106,97 ± 5,56	178 / 235	3
	<i>mev-1 (kn1)</i>	10,18 ± 0,64	11,06 ± 0,37	108,90 ± 3,27	11,24 ± 0,68	11,99 ± 0,56	106,76* ± 1,48	172 / 170	2
Ellagsäure	<i>eat-2 (ad465)</i>	23,14 ± 1,74	22,04 ± 1,83	95,50 ± 5,77	23,12 ± 1,21	22,23 ± 0,91	96,38 ± 3,26	178 / 216	3
	<i>mev-1 (kn1)</i>	10,18 ± 0,64	11,52 ± 0,52	113,30 ± 2,02	11,24 ± 0,68	12,27 ± 0,50	109,29* ± 2,16	172 / 202	2

Abkürzungen: Tg=Tage; SEM=Standardfehler des Mittelwertes; K=Kontrolle; n=Anzahl

* Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,05$; ** Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,005$

Tabelle A12: Lebensdauer von GS- und ES-behandelten Mutantenstämmen (Einzelversuche)

Tannin	Genotyp	Mediane Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	Mittlere Lebensdauer [Tg]		Variation [%]	n K/ Tannin
		K	Tannin		K	Tannin		
Gallussäure	eat-2 (ad465)	26,00	28,20	108,46	24,77	26,13	105,49	64 / 68
		23,43	23,44	100,04	23,83	23,39	98,15	54 / 92
		20,00	24,63	123,15	20,75	24,33	117,25*	60 / 75
	mev-1 (kn1)	10,82	11,43	105,64	11,92	12,55	105,29	66 / 69
		9,53	10,69	112,17	10,56	11,43	108,24*	106 / 101
Ellagsäure	eat-2 (ad465)	26,00	25,66	98,69	24,77	24,03	97,01	64 / 59
		23,43	19,75	84,29	23,83	21,55	90,43	54 / 78
		20,00	20,70	103,50	20,75	21,10	101,69	60 / 79
	mev-1 (kn1)	10,82	12,04	111,28	11,92	12,77	107,13	66 / 84
		9,53	10,99	115,32	10,56	11,77	111,46*	106 / 118

Abkürzungen: Tg=Tage; K=Kontrolle; n=Anzahl

* Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,05$; ** Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,005$

Tabelle A13: Thermotoleranztests mit Mutantenstämmen unter TS-Einfluss (Mittelwerte)

Genotyp	Inkubation bei 35°C (Std.)	Überlebende [%] ± SEM		Variation [%] ± SEM	n K / TS	n Ver- suche
		K	TS			
N2 (zum Vergleich)	8	47,94 ± 3,97	64,37 ± 2,35	136,47** ± 9,01	335 / 333	3
<i>age-1 (hx546)</i>	9	32,07 ± 2,75	54,93 ± 10,26	165,71** ± 18,66	378 / 362	4
<i>akt-2 (ok393)</i>	9	37,83 ± 0,40	51,63 ± 3,00	136,31** ± 6,49	251 / 277	2
<i>cav-1 (ok2089)</i>	8	53,47 ± 1,91	62,74 ± 3,42	117,75* ± 7,31	225 / 261	3
<i>daf-2 (m577)</i>	10	53,29 ± 6,51	61,73 ± 7,44	117,06* ± 6,86	356 / 323	5
<i>daf-12 (m20)</i>	8	47,22 ± 6,30	45,83 ± 9,95	93,50 ± 8,23	300 / 340	4
<i>daf-16 (mgDf50)</i>	7	43,61 ± 3,23	43,35 ± 0,94	101,59 ± 9,26	361 / 339	3
<i>eat-2 (ad465)</i>	9	68,50 ± 4,79	78,72 ± 4,70	115,19* ± 1,16	262 / 269	3
<i>jnk-1 (gk7)</i>	7	47,76 ± 2,44	65,75 ± 5,56	138,21** ± 10,38	290 / 294	4
<i>mev-1 (kn1)</i>	6	50,32 ± 5,34	51,00 ± 2,60	104,08 ± 7,00	211 / 191	4
<i>nhr-8 (ok186)</i>	8	45,24 ± 1,84	65,20 ± 6,83	142,93** ± 8,93	300 / 303	3
<i>numr-1(ok2239)</i>	7	37,85 ± 5,24	45,82 ± 10,18	114,92* ± 13,46	281 / 253	3
<i>osr-1 (rm1)</i>	7	49,23 ± 4,88	63,52 ± 7,40	128,51** ± 4,79	343 / 358	4
<i>sek-1 (ag1)</i>	7	56,81 ± 11,47	55,58 ± 12,93	98,26 ± 7,93	206 / 228	5
<i>sir-2.1 (ok434)</i>	7	45,59 ± 9,50	56,68 ± 11,81	125,14** ± 4,63	335 / 367	4
<i>skn-1 (zu67)</i>	6	45,11 ± 1,29	52,26 ± 1,81	116,03* ± 3,79	536 / 515	7
<i>unc-43 (n498n1186)</i>	8	64,44 ± 2,88	77,21 ± 3,05	119,93** ± 1,50	259 / 269	3

Abkürzungen: Tg=Tage; Std.=Stunden; SEM=Standardfehler des Mittelwertes; K=Kontrolle; TS=Tanninsäure; n=Anzahl

* Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,05$; ** Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,005$

Tabelle A14: Oxidative Stresstests mit Mutantenstämmen unter CT-Einfluss (Mittelwerte)

Genotyp	Inkubation mit H ₂ O ₂ (Std.)	Überlebende [%] ± SEM		Variation [%] ± SEM	n K / CT	n Ver- suche
		K	CT			
N2 (zum Vergleich)	8	47,70 ± 3,35	72,28 ± 2,29	153,52** ± 9,71	341 / 336	3
<i>age-1 (hx546)</i>	9	50,04 ± 4,77	47,97 ± 5,28	95,55 ± 4,17	362 / 388	4
<i>akt-2 (ok393)</i>	9	56,17 ± 4,09	66,58 ± 3,84	118,94* ± 1,83	274 / 301	3
<i>cav-1 (ok2089)</i>	8	60,52 ± 2,58	73,56 ± 3,03	122,44** ± 8,23	306 / 312	3
<i>daf-2 (m577)</i>	10	47,83 ± 1,45	57,52 ± 2,68	120,94* ± 7,96	310 / 302	4
<i>daf-12 (m20)</i>	8	59,09 ± 0,81	70,82 ± 2,21	120,05* ± 5,11	261 / 245	3
<i>daf-16 (mgDf50)</i>	7	54,46 ± 8,37	72,45 ± 8,45	135,42** ± 5,34	234 / 263	3
<i>eat-2 (ad465)</i>	9	63,04 ± 1,50	67,70 ± 1,97	107,38 ± 1,53	311 / 320	5
<i>jnk-1 (gk7)</i>	7	48,88 ± 1,16	56,97 ± 1,91	117,11* ± 6,52	412 / 384	4
<i>mev-1 (kn1)</i>	6	50,97 ± 2,88	67,04 ± 2,36	132,69** ± 6,46	283 / 294	5
<i>nhr-8 (ok186)</i>	8	42,26 ± 5,67	62,35 ± 5,59	150,46** ± 6,54	274 / 264	3
<i>numr-1(ok2239)</i>	7	56,19 ± 2,90	66,49 ± 1,14	119,09* ± 4,38	274 / 265	3
<i>osr-1 (rm1)</i>	7	51,55 ± 0,45	68,19 ± 4,50	132,46** ± 9,52	297 / 287	3
<i>sek-1 (ag1)</i>	7	53,20 ± 5,88	50,72 ± 3,02	99,74 ± 12,54	223 / 228	5
<i>sir-2.1 (ok434)</i>	7	51,27 ± 3,41	61,02 ± 1,61	120,52* ± 6,63	372 / 321	4
<i>skn-1 (zu67)</i>	6	33,29 ± 3,56	42,63 ± 2,89	129,86* ± 5,43	270 / 249	3
<i>unc-43 (n498n1186)</i>	8	52,40 ± 1,29	54,24 ± 1,88	103,42 ± 1,24	367 / 373	4

Abkürzungen: Tg=Tage; Std.=Stunden; SEM=Standardfehler des Mittelwertes; K=Kontrolle; CT=Catechin; n=Anzahl

* Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,05$; ** Variation der mittleren Lebensdauer ist signifikant mit $p < 0,005$

Publikationen

Artikel in Fachzeitschriften

Saul N, Pietsch K, Menzel R, Stürzenbaum SR, Steinberg CEW (2010): The longevity effect of tannic acid in *Caenorhabditis elegans*: Disposable Soma meets hormesis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 65, 626-635

Pietsch K, Hofmann S, Henkel R, **Saul N**, Menzel R, Steinberg CEW (2010) The plant polyphenol caffeic acid affects life traits differently in the nematode *Caenorhabditis elegans* and the cladoceran *Moina macrocopa*. *Fresenius Environmental Bulletin* 19, 1238-1244

Saul N, Pietsch K, Menzel R, Stürzenbaum SR, Steinberg CEW (2009): Catechin induced longevity in *C. elegans*: From key regulator genes to disposable soma. *Mech Ageing Dev.* 130, 477-486

Pietsch K, **Saul N**, Menzel R, Stürzenbaum SR, Steinberg CEW (2008): Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology* 10, 565-578

Saul N, Pietsch K, Menzel R, Steinberg CEW (2008): Quercetin-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: Is DAF-16 involved? *Mech Ageing Dev.* 129, 611-613

Steinberg CEW, **Saul N**, Pietsch K, Meinelt T, Rienau S, Menzel R (2007): Dissolved humic substances facilitate fish life in extreme aquatic environments and have the potential to extend lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Annals of Environmental Science* 1, 81-90

Böhning D, Boose R, Kurzwaski S, **Saul N** (2002): Bicycle Safety Helmet Usage in Berlin 1999: An Observational Study. *Sozial- und Präventivmedizin* 47, 001-004

Eingereicht:

Saul N, Pietsch K, Stürzenbaum SR, Menzel R, Steinberg CEW (2011) The diversity of tannin action in *C. elegans*: Between toxicity and longevity. *J Nat Prod.* Under review

Konferenzvorträge und Posterpräsentationen

- Saul N**, Pietsch K, Menzel R, Steinberg CEW (2009) *C. elegans* and the Disposable Soma Theory: Extended lifespan and reduced body size due to exposure to tannic acid and catechin. 17th International *C. elegans* Meeting in Los Angeles, POS 308 B
- Pietsch K, Stürzenbaum SR, **Saul N**, Menzel R, Steinberg CEW (2009) The physiological effects of polyphenol induced longevity. 17th International *C. elegans* Meeting in Los Angeles, POS 307 A
- Saul N**, Pietsch K, Menzel R, Steinberg CEW (2008) Analyzing quercetin mediated longevity in *C. elegans*. European Worm Meeting in Sevilla, Oral Presentation, T-14
- Kulas J, Schmidt C, Rothe M, Schunck WH, **Saul N**, Menzel R (2008) Cytochrome P450-dependent metabolism of eicosa-pentaenoic acid in the nematode *Caenorhabditis elegans*. European Worm Meeting in Sevilla, POS B-137
- Menzel R, Pietsch K, **Saul N**, Rienau S, Wild W, Staudacher H, Steinberg CEW (2008) Humic material induces behavioral and transcriptional responses in the nematode *Caenorhabditis elegans* and extends its lifespan. European Worm Meeting in Sevilla, POS B-146
- Pietsch K, **Saul N**, Menzel R, Stürzenbaum S, Steinberg CEW (2008) Effects of rosmarinic acid and (+/-)-catechin on *Caenorhabditis elegans* lifespan. European Worm Meeting in Sevilla, POS C-155
- Steinberg CEW, **Saul N**, Pietsch K, Menzel R (2007) Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by a model humic building block. 10th Humic Science & Technology Conference in Boston, oral presentation
- Pietsch K, **Saul N**, Menzel R, Steinberg CEW (2007) Verlängerung der Lebensdauer durch das Polyphenol Quercetin im Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz. 59, 189
- Saul N**, Pietsch K, Menzel R, Steinberg CEW (2007) Quercetin Extends Lifespan in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. Genetics of Aging, 39th Annual conference of the German Genetics Society (GfG) in Jena, POS 42
Ausgezeichnet mit dem Posterpreis der Konferenz
- Reichert K, **Saul N**, Menzel R (2003) Entwicklung und Validierung eines Biomonitor-Tests auf Grundlage der schadstoffinduzierbaren Genexpression von *Caenorhabditis elegans* – Der Celegans Toxchip. SETAC-GLB, New Blood in Ecotoxicology, Tagungsband S. 40
- Saul N**, Reichert K, Rödel M, Menzel R (2003) Comparison of reproduction and xenobiotically induced gene expression as ecotoxicological test parameters in the nematode *C. elegans*. 14th International *C. elegans* Meeting in Los Angeles, POS 386 B

Danksagung

Zunächst möchte ich mich für die hilfreiche und inspirierende Unterstützung sowie für die vielen interessanten Denkanstöße von Herrn Prof. Dr. Steinberg bedanken. Herrn Dr. Menzel danke ich insbesondere für die stetige Hilfestellung im Labor und bei der Verfassung zahlreicher, wissenschaftlicher Schriften. Meiner Kollegin Kerstin Pietsch möchte ich für viele Motivationsschübe und Ideen danken, als auch für die gute Unterhaltung und Atmosphäre beim Würmer zählen. Allen Studenten, Diplomanden und Doktoranden möchte ich vor allen Dingen für die gute Zusammenarbeit und für die (meist) gute Laune danken.

Zudem möchte ich mich bei dem Team am King's College in London bedanken. Insbesondere Herr Dr. Stephen Stürzenbaum stand jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und hat großen Einfluss auf das Gelingen der Publikationen genommen. Dr. Suresh Swain möchte ich für die anspruchsvolle und zeitaufwändige Hilfestellung bei der Microarray-Analyse danken. Den anderen Mitarbeitern, Doktoranden und Studenten danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und Hilfe bei Problembewältigungen.

Nicht zuletzt möchte ich auch meinem privaten Umfeld danken. Meinem Freund Torsten danke ich insbesondere für die Geduld und für das mir entgegengebrachte Verständnis als auch für die stetige mentale Unterstützung. Meiner gesamten Familie möchte ich danken, dass sie diesen Weg für mich geebnet haben. Speziell ohne die Unterstützung meiner Mutter Ilona Saul als auch meiner Großeltern wäre ich nicht so weit gekommen. Außerdem möchte ich meinen Freunden danken, dass sie mich immer wieder ermuntert haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht.

Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin.